

**APLICACIÓN DE PROCEDIMIENTOS ESTANDARIZADOS PARA EL ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS, AGUAS Y COSMÉTICOS EN EL
LABORATORIO MICROBIOLÓGICO DE LA EMPRESA ALS LIFE SCIENCES
COLOMBIA**



DAIANNA MELISA PABÓN MONSALVE

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2021**

**APLICACIÓN DE PROCEDIMIENTOS ESTANDARIZADOS PARA EL ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS, AGUAS Y COSMÉTICOS EN EL
LABORATORIO MICROBIOLÓGICO DE LA EMPRESA ALS LIFE SCIENCES
COLOMBIA**

DAIANNA MELISA PABÓN MONSALVE

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR EL TÍTULO DE
MICROBIÓLOGA**

**ASESOR ACADEMICO
LADY YESENIA SUAREZ PhD.**

**ASESOR EMPRESARIAL
YESMIRETH MARTÍNEZ**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2021**

NOTA DE ACEPTACIÓN:

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Pamplona, Septiembre 2021

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
1. OBJETIVOS.....	2
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2. JUSTIFICACIÓN.....	3
3. MARCO REFERENCIAL.....	5
3.1 ESTADO DEL ARTE	5
3.2 RESEÑA HISTÓRICA DE LA EMPRESA ALS LIFE SCIENCES COLOMBIA	7
3.3 MARCO LEGAL	9
3.4 MARCO TEÓRICO.....	11
3.4.1 MEDIOS DE CULTIVO	11
3.4.2 ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LOS MEDIOS PREPARADOS	11
3.4.3 MEDIOS DE CULTIVO USADOS PARA EL CRECIMIENTO DE LOS MOHOS Y LEVADURAS DENTRO DEL LABORATORIO ALS	12
3.4.4 CALIDAD DEL AGUA	15
3.4.5 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS ALIMENTOS.....	17
3.4.6 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS COSMÉTICOS	19
3.4.7 METODOLOGÍAS RÁPIDAS PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS	19
4. METODOLOGÍA.....	23
4.1 USO DE METODOLOGÍAS CONVENCIONALES PARA EVALUAR LA CALIDAD DE LOS ALIMENTOS.	23
4.2 USO DE METODOLOGÍAS RÁPIDAS	26
4.2.1 DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS SEROGRUPOS MÁS COMUNES DE <i>Escherichia coli</i> RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE TOXINA SHIGA MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA PCR BAX® Q7	26
4.2.4 DETECCIÓN MOLECULAR DE <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Campylobacter lari</i> y <i>Campylobacter coli</i> MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA PCR BAX Q7 EVALUADO POR LA AOAC	32
4.3 ANÁLISIS DE AGUAS POTABLES O TRATADAS Y DE RIEGO	35
4.3.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS POTABLES Y ENVASADAS POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA.....	35
4.3.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS DE RIEGO MEDIANTE EL MÉTODO DE NMP.	37
4.4 METODOLOGÍAS PARA ESTERILIDAD COMERCIAL Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS.....	37

4.4.1	ÁREA DE ANÁLISIS ESPECIALES- ESTERILIDAD COMERCIAL MEDIANTE LA NTC 4433 DEL 2015	38
4.4.2	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS COSMÉTICOS SIGUIENDO LOS PARÁMETROS ESTABLECIDOS EN LA RESOLUCIÓN 2120 DEL 2019 DISPUESTA POR LA COMUNIDAD ANDINA	40
4.5	EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA MOHOS Y LEVADURAS	42
4.5.1	PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DRBC	43
4.5.2	PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO SABOURAUD CLORANFENICOL	44
4.5.3	PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO EXTRACTO DE MALTA	45
4.5.4	PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DG 18	46
4.5.5	ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO	47
4.5.6	PRODUCTIVIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO.....	48
4.5.7	SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO	49
4.5.8	ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO	50
5.	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	51
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
6.1	RESULTADOS ESPERADOS DE LA METODOLOGÍA CONVENCIONAL O TRADICIONAL EN RECUENTO EN PLACA.....	52
6.2	RESULTADOS ESPERADOS DE LAS METODOLOGÍAS RÁPIDAS	63
6.2.1	PCR- SISTEMA BAX	63
6.2.2	RESULTADOS ESPERADOS PARA LOS SEROGRUPOS DE <i>Escherichia coli</i> PRODUCTORES DE TOXINA SHIGA.....	64
6.2.3	RESULTADOS ESPERADOS PARA <i>E. coli</i> O157:H7	66
6.2.4	RESULTADOS ESPERADOS PARA <i>Listeria monocytogenes</i>	68
6.2.5	RESULTADOS ESPERADOS PARA <i>Campylobacter</i> spp.....	70
6.2.6	RESULTADOS ESPERADOS PARA <i>Salmonella</i> spp.....	72
6.3	RESULTADOS ESPERADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS POTABLES Y ENVASADAS POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA	74
6.4	RESULTADOS ESPERADOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS DE RIEGO MEDIANTE EL MÉTODO DE NMP.....	76
6.5	RESULTADOS ESPERADOS PARA ESTERILIDAD COMERCIAL Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS.....	78
6.5.1	RESULTADOS ESPERADOS PARA ESTERILIDAD COMERCIAL.....	78
6.5.2	RESULTADOS ESPERADOS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS.....	79

6.6 ESTANDARIZACIÓN DE LOS INÓCULOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA MOHOS Y LEVADURAS.....	84
6.6.1 ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO DE LA CEPA NO TARGET.....	91
6.7 RESULTADOS DE CONTROLES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS	95
6.7.1 CONTROL NEGATIVO	95
6.7.2 PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS.....	96
6.8 RESULTADOS PARA EVALUAR LA VIDA ÚTIL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO .	96
6.8.1 RESULTADOS DURANTE 6 DÍAS DE LA PRODUCTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	97
6.8.2 SELECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	106
6.9 RESULTADOS DE LAS PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	111
7. CONCLUSIONES	117
8. RECOMENDACIONES	118
9. GLOSARIO	119
10. BIBLIOGRAFÍA.....	122
11. ANEXOS.....	131

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características microbiológicas del agua potable.

Tabla 2. Metodologías convencionales

Tabla 3. Resultados de los análisis microbiológicos realizados para un queso fresco por metodologías convencionales

Tabla 4. Resultados hipotéticos de un análisis microbiológico de un perro caliente.

Tabla 5. Resultados hipotéticos de un análisis microbiológico en una muestra de agua de riego.

Tabla 6. Resultados hipotéticos del análisis organoléptico de una muestra de leche entera.

Tabla 7. Resultados del crecimiento obtenido para evaluar la esterilidad comercial del producto de una lecha entera UHT.

Tabla 8. Resultados hipotéticos del análisis microbiológico de una muestra de jabón.

Tabla 9. Crecimiento de *Candida albicans* en medio extracto de malta – estandarización

Tabla 10. Crecimiento de *Candida albicans* en medio DRBC – estandarización

Tabla 11. Crecimiento de *Candida albicans* en medio Sabouraud + Cloranfenicol – estandarización.

Tabla 12. Crecimiento de *Candida albicans* en medio DG -18 – estandarización.

Tabla 13. Crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* en medio extracto de malta – estandarización.

Tabla 14. Crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* en medio DRBC– estandarización.

Tabla 15. Crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* en medio Sabouraud-Cloranfenicol – estandarización.

Tabla 16. Crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* en medio DG-18 – estandarización

Tabla 17. Crecimiento de *Escherichia coli* en medio TSA– estandarización.

Tabla 18. Crecimiento de *Escherichia coli* en medio extracto de malta – estandarización.

Tabla 19. Crecimiento de *Escherichia coli* en medio Sabouraud + Cloranfenicol – estandarización.

Tabla 20. Crecimiento de *Escherichia coli* en medio DG -18 – estandarización.

Tabla 21. Crecimiento de *Escherichia coli* en medio DRBC – estandarización.

Tabla 22. Control negativo de los medios de cultivo

Tabla 23. Productividad de *Candida albicans* primer día.

Tabla 24. Productividad de *Candida albicans* segundo día

Tabla 25. Productividad de *Candida albicans* tercer día.

Tabla 26. Productividad de *Candida albicans* cuarto día.

Tabla 27. Productividad de *Candida albicans* quinto día.

Tabla 28. Productividad de *Candida albicans* sexto día.

Tabla 29. Productividad de *Candida albicans* en medio extracto de malta.

Tabla 30. Productividad de *Candida albicans* en medio DRBC

Tabla 31. Productividad de *Candida albicans* en medio DG-18

Tabla 32. Productividad de *Candida albicans* en medio Sabouraud + Cloranfenicol

Tabla 33. Productividad de *Aspergillus brasiliensis* primer día.

Tabla 34. Productividad de *Aspergillus brasiliensis* segundo día.

Tabla 35. Productividad de *Aspergillus brasiliensis* tercer día.

Tabla 36. Productividad de *Aspergillus brasiliensis* cuarto día.

Tabla 37. Productividad de *Aspergillus brasiliensis* quinto día.

Tabla 38. Productividad de *Aspergillus brasiliensis* sexto día.

Tabla 39. Productividad *Aspergillus brasiliensis* en medio extracto de malta.

Tabla 40. Productividad *Aspergillus brasiliensis* en medio DRBC

Tabla 41. Productividad *Aspergillus brasiliensis* en medio DG-18

Tabla 42. Productividad *Aspergillus brasiliensis* en medio Sabouraud + cloranfenicol

Tabla 43. Selectividad de *Escherichia coli* primer día.

Tabla 44. Selectividad de *Escherichia coli* segundo día.

Tabla 45. Selectividad de *Escherichia coli* tercer día.

Tabla 46. Selectividad de *Escherichia coli* cuarto día.

Tabla 47. Selectividad de *Escherichia coli* quinto día.

Tabla 48. Selectividad de *Escherichia coli* sexto día.

Tabla 49. Desempeño del medio de cultivo extracto de malta con base a su selectividad.

Tabla 50. Desempeño del medio de cultivo DRBC con base a su selectividad

Tabla 51. Desempeño del medio de cultivo DG-18 con base a su selectividad.

Tabla 52. Desempeño del medio de cultivo SABOURAUD + CLORANFENICOL con base a su selectividad.

Tabla 53. Resumen del desempeño de los medios DRBC, DG-18, Sabouraud + cloranfenicol y Extracto de malta durante un periodo de 6 días.

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1. Sedes de la empresa ALS, año 2020.

Imagen 2. Empresa ALS, sede Bogotá.

Imagen 3. PCR – Sistema BAX

Imagen 4. Archivo del sistema BAX

Imagen 5. Coagulasa positivo para *Staphylococcus aureus*, (prueba de confirmación)

Imagen 6. Crecimiento de *Salmonella* spp. en el medio de cultivo XLD/HEKTOEN

Imagen 7. Crecimiento de *Bacillus cereus* en agar sangre de oveja.

Imagen 8. Crecimiento de microorganismos en medio de cultivo Plate Count.

Imagen 9. Modelo de la hoja de resultados expuesta en la pantalla del computador bajo el sistema BAX.

Imagen 10. Ejemplos típicos de curvas que representan la presencia del microorganismo *E. coli* O157:H7

Imagen 11. Ejemplo de gráfica correspondiente a una muestra positiva para *Listeria monocytogenes*.

Imagen 12. Ejemplo de resultados cuantitativos de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* y el IPC

Imagen 13. Ejemplo de gráficas que representan la presencia de *Salmonella* spp. en una muestra

Imagen 14. Resultado con crecimiento de Coliformes Totales; método filtración por membrana

Imagen 15. Resultado con crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*

Imagen 16. Análisis mediante la técnica NMP para Coliformes fecales en lauril sulfato de triptona. Resultado positivo para agua de riego.

Imagen 17. Estandarización del inóculo en cabina de bioseguridad

Imagen 18. Resultados control negativo en los medios de cultivo

LISTA DE GRÁFICAS

Grafica 1. Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231 en diferentes medios de cultivo.

Grafica 2. Crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 en los cuatro medios de cultivo a evaluar.

Grafica 3. Evaluación del crecimiento de *Escherichia coli* en los diferentes medios de cultivo usados para el crecimiento de mohos y levaduras.

Grafica 4. Evaluación de la productividad de *Candida albicans* en los cuatro medios de cultivo durante un tiempo de 6 días.

Grafica 5: Productividad de *Aspergillus brasiliensis* en los cuatro medios de cultivo durante un periodo de 6 días.

Gráfica 6: Trazabilidad del pH de los medios del cultivo durante un periodo de 6 días.

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO A.** Ficha técnica del medio de cultivo DG-18
- ANEXO B.** Ficha técnica del medio DRBC
- ANEXO C.** Ficha técnica del medio extracto de malta
- ANEXO D.** Ficha técnica del medio extracto de levadura dextrosa cloranfenicol
- ANEXO E.** Ficha técnica del medio Saboraud cloranfenicol
- ANEXO F.** Propiedades físico químicas de los medios de cultivo evaluados para la estandarización.
- ANEXO G.** Propiedades físico químicas de los medios de cultivo, primer día.
- ANEXO H.** Propiedades físico químicas de los medios de cultivo, segundo día.
- ANEXO I.** Propiedades físico químicas de los medios de cultivo, tercer día.
- ANEXO J.** Propiedades físico químicas de los medios de cultivo, cuarto día.
- ANEXO K.** Propiedades físico químicas de los medios de cultivo, quinto día.
- ANEXO L.** Propiedades físico químicas de los medios de cultivo, sexto día.

INTRODUCCIÓN

El control de calidad en un laboratorio de Microbiología es fundamental para garantizar la fiabilidad y la validez de los resultados. En este sentido, una serie de factores y eventos deben ser controlados, tales como el monitoreo de medios de cultivo, reactivos, inocuidad de los materiales y su vida útil, factores ambientales, calibración, nivel de confianza en los equipos, evaluación del personal analista y validación de los métodos. De esta manera brindará confianza tanto al personal de la empresa como al cliente y fiabilidad en los resultados emitidos.

El desarrollo del trabajo de pasantía dentro de la empresa ALS Life Sciences Colombia se enfocó en los procedimientos para la evaluación de la calidad e inocuidad de alimentos, aguas, productos farmacéuticos y la vida útil de los medios de cultivo formulados químicamente utilizados para el aislamiento de mohos y levaduras. El análisis de la vida útil de un medio de cultivo permite garantizar la calidad de la función de este material y ofrecer confiabilidad en los resultados obtenidos, lo que constituye el aseguramiento de la calidad. Para tal fin se emplea la normativa ISO 11133 del 2014 la cual constituye una norma obligatoria para todos los laboratorios acreditados que realizan análisis microbiológicos de alimentos, piensos y aguas. La norma define los aspectos relacionados con la garantía de la calidad, teniendo en cuenta los procedimientos y responsabilidades del laboratorio, fabricantes y proveedores de los medios de cultivo en cuanto a la preparación, producción, almacenamiento y pruebas de rendimiento de los mismos mejorando así la fiabilidad de los análisis microbiológicos realizados y el rendimiento de los medios de cultivo destinados al análisis microbiológico de alimentos y aguas.

La norma ISO 17025 del 2017 también fue tomada en cuenta ya que ésta hace posible que los laboratorios demuestren que tienen las competencias necesarias para producir resultados válidos y confiables mediante el cumplimiento de los requisitos que allí se establecen.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Aplicar procedimientos estandarizados para el análisis microbiológico de alimentos, aguas y cosméticos en el laboratorio microbiológico de la empresa ALS Life Sciences Colombia.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la calidad microbiológica de alimentos, agua potable, aguas envasadas, agua de piscina, agua de riego y productos cosméticos a través de metodologías convencionales de acuerdo a lo dispuesto en la normativa.
- Comprobar la esterilidad comercial de alimentos envasados herméticamente que sean catalogados como estériles mediante análisis microbiológicos convencionales.
- Aplicar metodologías rápidas para la detección de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 y los serogrupos más implicados en Enfermedades Transmitidas por Alimentos.
- Evaluar el desempeño de los medios de cultivo para mohos y levaduras DRBC, DG-18, Sabouraud + cloranfenicol y extracto de malta, bajo condiciones de conservación a 55°C por un periodo de seis días.

2. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo se enfoca en el estudio y el análisis de alimentos, aguas y cosméticos en el área de Microbiología, suministrados por los clientes al laboratorio ALS, de acuerdo a sus necesidades.

El enfoque del trabajo va ligado al desarrollo de las prácticas empresariales realizadas, de tal manera que se podrá conocer cómo se ejecutan los procesos una vez el material de trabajo es recepcionado por la empresa. Para llevar a cabo los procesos, la empresa cuenta con una serie de normativas por las que se rige. La norma ISO 17025 del 2017 desglosa los diferentes puntos que debe tener en cuenta cualquier laboratorio en el área de calidad para llevar a cabo diversos tipos de análisis. Sus metodologías son validadas permitiendo cumplir a cabalidad con lo establecido en dicha norma y de esta manera, certificar o emitir un resultado sobre el producto analizado.

Los procesos que se realizan dependen de los requerimientos del cliente, ya que muchos de ellos se certifican con la empresa de acuerdo a lo solicitado, mientras que otros, por evaluar sus condiciones higiénicas y llevar una trazabilidad de su producto de acuerdo a sus lotes.

Dentro de las metodologías se encuentran las convencionales para la detección de microorganismos indicadores, así como la detección de microorganismos patógenos o microorganismos de alta prevalencia en determinado producto alimenticio. También se encuentran las metodologías rápidas desarrolladas mediante equipos de alta sensibilidad y especificidad cuyo fin es determinar la calidad e inocuidad de los alimentos o productos.

Además del desarrollo habitual de los procesos dentro del laboratorio, fue necesario obtener una base de datos que permitiera corroborar la calidad de los medios de cultivos usados para el crecimiento de mohos y levaduras considerado como una esencial y buena práctica de laboratorio, con el fin de mantener la confianza y efectividad en la ejecución de cualquier técnica microbiológica. El proceso se limitó a evaluar el desempeño de los medios de cultivo DRBC, DG-18,

Sabouraud más cloranfenicol y extracto de malta que se usan para aislar mohos y levaduras durante un periodo de 6 días. Actualmente, la empresa no cuenta con un estudio frente a la vida útil de estos medios en condiciones de temperatura de 55°C en medio líquido.

La mayoría de medios de cultivo usados en la empresa se mantienen por un periodo de 5 días como máximo, no obstante, teniendo en cuenta las condiciones nutricionales y factores fisicoquímicos que presenta; este factor varía de acuerdo al rótulo y las condiciones generadas por la casa comercial. Por tal motivo, es necesario evaluar la vida útil y el desempeño que mantienen estos medios frente a las condiciones por las que se mantienen conservadas.

La empresa al poseer un gran flujo de producción, requiere de una gran demanda de estos medios de cultivo listos para su uso y para evitar su gelificación se mantienen en una incubadora a 55°C como método de conservación. El tiempo y las contingencias juegan un papel importante durante el manejo de estos medios, ya que muchas veces se deben priorizar algunas muestras frente a otras debido a los análisis microbiológicos que requieren.

Determinar la vida útil de estos medios permitirá que los procesos sean satisfactorios, seguros y que las propiedades del medio no afecten en ningún momento los resultados de la recuperación microbiana de mohos y levaduras, arrojen falsos positivos o se presente una contaminación cruzada.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 ESTADO DEL ARTE

En el artículo “Evaluación de los medios de cultivo para verificar su reproductibilidad y selectividad” expuesto por Campos (2013) se evaluó cada uno de los procedimientos específicos establecidos en el área de control de calidad de medios, para verificar la reproducibilidad y selectividad de los medios de cultivos utilizados en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Coiima, México.

También en el artículo “Tiempo de vida útil de medios de cultivo” expuesto por Mamani (2016) se determinó el tiempo de vida útil de medios de cultivo líquidos, semisólidos y sólidos a través del control de pH y humedad evidenciando que no existían variaciones considerables en los medios de cultivo analizados, que permitieran la inhibición o desarrollo de los microorganismos.

Por su parte, Petro y Wees (2013) en su trabajo de grado titulado “Evaluación de la calidad fisicoquímica y microbiológica del agua del municipio de Turbaco Bolívar, Caribe Colombiano” evaluaron las características físicas, químicas y biológicas del agua para consumo en el municipio de Turbaco (Bolívar). Para el cumplimiento de sus objetivos llevaron a cabo una serie de actividades como reconocimiento de campo, ubicación de 9 puntos de muestreo y análisis de parámetros de calidad del agua basados en la Resolución MPS 2115 del 2007. Una vez realizadas estas actividades, encontraron que varios de los factores fisicoquímicos en los distintos puntos de muestreo sobrepasaban los valores límites permitidos. Dentro de sus conclusiones, consideraron que el causante de este problema es la ausencia de cloro libre, dando lugar a la deficiencia del proceso de tratamiento.

También Campuzano *et al.* (2015) en su artículo “Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá D.C.” determinaron la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá D.C. Se realizaron recuentos de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, *Staphylococcus*

aureus, *Bacillus cereus*, esporas de *Clostridium* sulfito reductor, determinación de Coliformes totales y fecales e investigación de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. Los hallazgos obtenidos en este estudio califican a la mayoría de puestos de venta ambulatoria de alimentos con riesgo sanitario alto.

También en el artículo “Determinación de la calidad microbiológica de cosméticos capilares elaborados a base de compuestos naturales comercializados en Lima Metropolitana” expuesto por Cáceres (2018) determinó la calidad microbiológica de cosméticos capilares elaborados a base de compuestos naturales comercializados en Lima. Se analizaron 48 muestras de cosméticos capilares y como resultados se determinó que el 17% de las muestras analizadas obtuvieron resultados fuera de especificación en recuento de aerobios mesófilos. En el 58% de muestras analizadas, se determinó la presencia de patógenos o el crecimiento de alguna bacteria asociada a estos. El 17% de las muestras analizadas tuvieron presencia de *S. aureus*, el 4% de *P. aeruginosa* y el 2% de *E. coli*. Con respecto a los microorganismos asociados a estas bacterias patógenas, se obtuvo un 15% de muestras con presencia de coliformes, un 2% con la presencia de un microorganismo asociado a *S. aureus* y un 19% que corresponde al crecimiento de bacterias pertenecientes al “Complejo *Burkholderia cepacia*” (CBc). En conclusión, se determinó que los cosméticos capilares comercializados en Lima metropolitana, no cumplen con las especificaciones microbiológicas emitidas por los entes reguladores.

También, Valcárcel (2014) en su trabajo de grado “Aplicación de métodos moleculares a la detección y tipificación de patógenos alimentarios en alimentos” determinó la presencia de patógenos emergentes del género *Arcobacter* y *Salmonella* spp. en 7 muestras de alimentos mediante la técnica de PCR. Se obtuvieron alícuotas directamente de la muestra homogenizada con un caldo de enriquecimiento selectivo y después de incubar el caldo durante 48 horas. Mediante esta técnica no se consiguió detectar ninguna bacteria del género *Arcobacter*, pero si se detectó *Salmonella* spp. en dos muestras (28,57%), tras la fase de enriquecimiento.

3.2 RESEÑA HISTÓRICA DE LA EMPRESA ALS LIFE SCIENCES COLOMBIA

La historia corporativa de ALS se remonta a Peter Morrison Campbell, quien estableció una pequeña empresa química en Australia en 1863 y emprendió en la industria de jabones agregando posteriormente productos de desinfección y limpieza. El primer nombre de la empresa fue Campbell Brothers Limited. Esa empresa, Campbell Brothers Limited, se convirtió en una empresa negociada públicamente al comenzar a cotizarse en la bolsa de valores australiana en 1952.

Hasta el 2012, el nombre de la empresa fue modificado por ALS LIMITED (Australian Laboratory Services). Al inicio de las operaciones de Australian Laboratory Services en el año 1976; la empresa de Campbell fue introduciendo su capital y acciones sobre ella hasta tal punto que se convirtió en la sede principal. La empresa dedicó sus servicios de química analítica para las industrias de exploración de minerales y esquisto bituminoso.

En 1981, Campbell Brothers Limited adquirió Australian Laboratory Services y comenzó un viaje que vería a ALS convertirse en una de las empresas comerciales de servicios de laboratorio más grandes y respetadas del mundo.

Después de un rápido crecimiento y diversificación en Australia durante la década de 1980, ALS se extendió a Asia y Sudamérica en la década de 1990, a Norteamérica, África y Europa a principios de la década de 2000 y, por último, a Medio Oriente en 2011.

Con el paso del tiempo la empresa ha adquirido distintas empresas las cuáles ha ayudado a crecer la compañía, entre las cuáles se encuentra: laboratorios mineros norteamericanos 'Chemex Labs' en diciembre de 1999 y 'Bondar Clegg' en diciembre de 2001. Actualmente en Colombia, cuenta con dos sedes en dos ciudades importantes del país, con su principal sede en Bogotá, D.C. tal y como se muestra en la imagen 1.

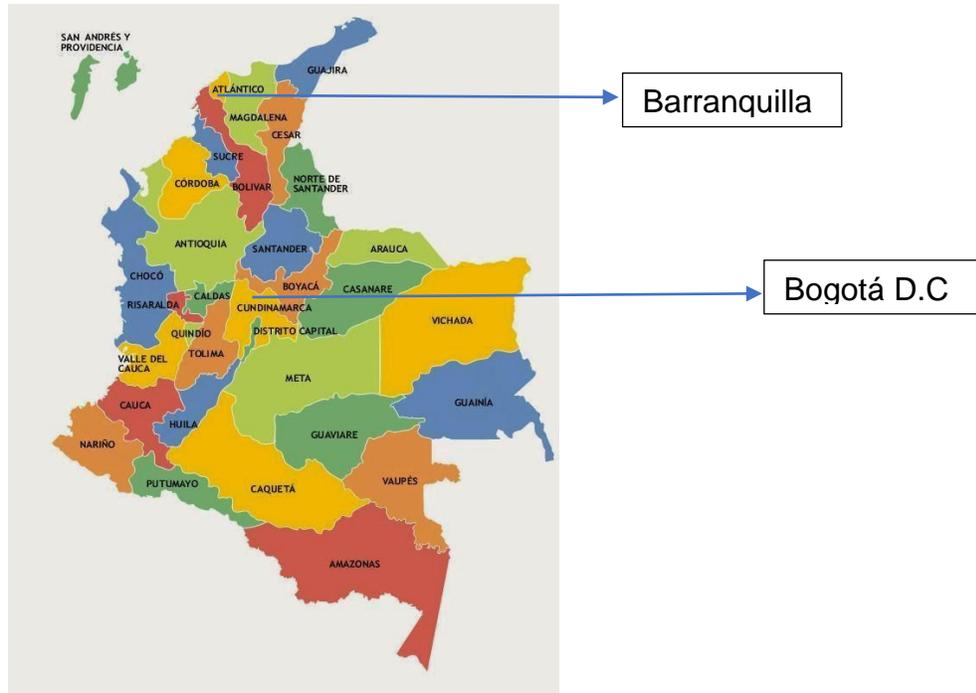


Imagen 1. Sedes de la empresa ALS, año 2020.

La sede de Bogotá comprende tres áreas que brindan un servicio a la comunidad y consisten en análisis sensorial, análisis fisicoquímicos y análisis microbiológico; que incluye: seguridad y calidad alimentaria, productos de consumo, análisis de inocuidad farmacéutica y análisis de aguas. Su ubicación se encuentra registrada en la localidad de Barrios Unidos, en la dirección Calle 94 B N° 56 – 45 Bogotá D.C. tal y como se muestra en la imagen 2.

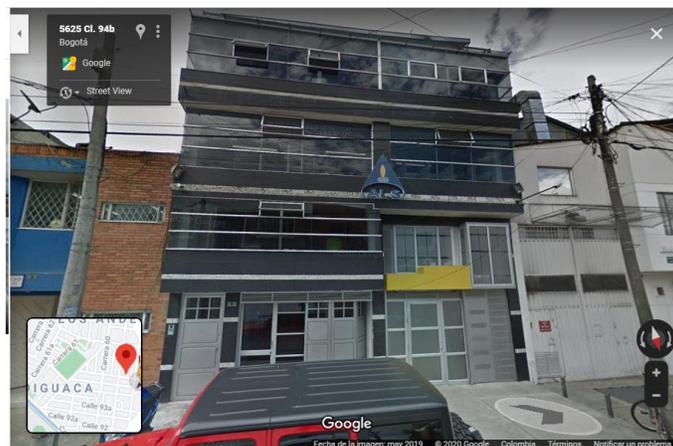


Imagen 2. Empresa ALS, sede Bogotá.

3.3 MARCO LEGAL

Para el desarrollo de los procedimientos en el laboratorio se tuvieron en cuenta las siguientes normativas:

- **Decreto 1575 de 2007.** Expedido por el Ministerio de Protección Social, por el cual se establece el sistema para la protección y control de la calidad del agua para consumo humano.
- **Decreto 219 de 1998.** Emanado por el Ministerio de Salud, por el cual se reglamentan parcialmente los regímenes sanitarios de control y calidad, de vigilancia de los productos cosméticos, y se dictan otras disposiciones.
- **ISO 11133:2014.** Establece todo lo relacionado a preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo.
- **ISO 6888-1: 1999.** Describe el método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa positivos (*Staphylococcus aureus* y otras especies).
- **ISO 7932: 2004.** Norma técnica colombiana que especifica un método horizontal para el recuento de *Bacillus cereus* viables mediante la técnica de recuento de colonias a 30 °C.
- **NTC ISO/IEC 17025:2017.** Estandariza prácticas, procesos para la realización de ensayos y calibraciones, permitiendo que los laboratorios cuenten con un sistema de calidad que les garantice la competencia técnica necesaria para producir resultados válidos y confiables.
- **NTC 4772.** Norma técnica colombiana, que describe la metodología para detección y recuento de *Escherichia coli* y de bacterias Coliformes mediante filtración por membrana.

- **Resolución 2115 de 2007.** Expedida por el Ministerio de Protección Social, por medio de la cual se señalan las características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano.

- **Resolución 002511 de 1995.** Expedida por el Ministerio de Salud, por la cual se adopta el manual de normas técnicas de calidad/guías técnicas de análisis para medicamentos, materiales médicos quirúrgicos, y cosméticos.

- **Resolución 02800 de 1998.** Expedida por el Ministerio de Salud, por la cual se establece el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura para los productos cosméticos importados en los casos en que las autoridades sanitarias no emitan el certificado de cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura.

- **Resolución 3773 de 2004.** Expedida por el Ministerio de Protección Social, por la cual se adopta la guía de capacidad para la fabricación de productos cosméticos.

- **Resolución 003774 de 2004.** Expedida por el Ministerio de Protección Social, por la cual se adopta la Norma Técnica Armonizada de Buenas Prácticas de Manufactura Cosmética y la guía de la verificación de las BPMC.

- **Resolución 1229 de 2013.** Expedida por el Ministerio de Salud y el Ministerio de Protección Social por la cual se establece el modelo de inspección, vigilancia y control sanitario para los productos de uso y consumo humano.

- **Resolución 2674 de 2013.** Expedida por el Ministerio de Salud y el Ministerio de Protección Social, por la cual se establecen los requisitos sanitarios que se deben cumplir para las actividades de fabricación, procesamiento, preparación, envase, almacenamiento, transporte, distribución y comercialización de

alimentos según el riesgo en salud pública, con el fin de proteger la vida y la salud de las personas.

- **Resolución 2120 de 2019.** Reglamento Técnico Andino expedido por la Secretaría General de la Comunidad Andina, el cual establece las especificaciones técnicas microbiológicas para productos cosméticos.

3.4 MARCO TEÓRICO

3.4.1 MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es una preparación sólida o líquida empleada para cultivar, transportar y almacenar microorganismos. Para ser efectivo, el medio debe contener todos los nutrientes que el microorganismo necesita para multiplicarse. Los medios especializados son esenciales en el aislamiento e identificación de microorganismos, en ensayos de sensibilidad a antibióticos, análisis de alimentos y de agua, microbiología industrial, entre otras actividades. El conocimiento del hábitat normal del microorganismo suele ser útil para seleccionar un medio de cultivo apropiado, ya que sus necesidades nutricionales son un reflejo de su entorno natural. Frecuentemente se usa un medio para seleccionar y cultivar microorganismos específicos o para ayudar en la identificación de una especie en particular, en estos casos, la función del medio también determinará su composición (Brooks *et al.*, 2010).

3.4.2 ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LOS MEDIOS PREPARADOS

La estabilidad de los medios de cultivo preparados es limitada; algunas fórmulas que contienen sustancias inestables tales como antibióticos deben emplearse inmediatamente después de su preparación. En los casos en que el medio conste de una base o sustancias agregadas posteriormente (como Baird Parker, agar

sangre) es preferible preparar la base que puede almacenarse y el día de su uso agregar el complemento inestable. La mayoría de los medios deben de conservarse en refrigeración entre 4 y 10°C durante un tiempo limitado, debido a su deshidratación. Otros medios, como los que contienen tioglicolato o fosfatos se conservan mejor a temperatura ambiente. Es recomendable conservar los medios de cultivo en placa en bolsas de plástico para evitar su deshidratación. Debe permitirse que los medios conservados en refrigeración adquieran a temperatura ambiente antes de su empleo (Campos, 2013).

3.4.3 MEDIOS DE CULTIVO USADOS PARA EL CRECIMIENTO DE LOS MOHOS Y LEVADURAS DENTRO DEL LABORATORIO ALS

Aunque todos los microorganismos necesitan fuentes de energía, carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y varios minerales, la composición precisa de un medio satisfactorio dependerá de la especie que se desea cultivar, pues las necesidades nutricionales varían enormemente.

3.4.3.1 SABOURAUD CLORANFENICOL AGAR

Este medio de cultivo consiste en el clásico agar de Sabouraud al que se le ha añadido el cloranfenicol, antibiótico termoestable de amplio espectro antibacteriano, para permitir un aislamiento selectivo de mohos en diferentes muestras (Ajello, 1957).

3.4.3.2 EXTRACTO DE MALTA AGAR

Es un medio ácido que apoyará el crecimiento de la mayoría de las levaduras y mohos mientras inhibe la mayoría de las bacterias. Fue descrito por primera vez por Thom y Church en 1926 en un estudio de *Aspergillus* spp. El contenido de carbohidratos asegura un rápido crecimiento. La selectividad se puede aumentar reduciendo aún más el pH con la adición, después de la esterilización, de ácido láctico. Cabe señalar que el exceso de calentamiento de este medio junto con su

bajo pH puede fácilmente resultar en la hidrólisis del gel de agar produciendo placas blandas (Galloway, 1952).

3.4.3.3 AGAR DICLORAN ROSA DE BENGALA CLORANFENICOL (DRBC)

Es un agar selectivo para el recuento de levaduras y mohos viables en productos destinados a consumo o como alimento para animales que tengan una actividad hídrica superior a 0,95. La enumeración se realiza mediante la técnica de recuento de colonias a 25 ± 1 °C, como se describe en la ISO 21527-1: 2008. El medio DRBC se basa en la fórmula descrita por King *et al.*, y desarrollado con referencia a la ISO 21527-1: 2008 para la enumeración de levaduras y mohos en alimentos y productos animales. El medio se utiliza para la enumeración de levaduras y mohos viables en productos con una actividad de agua superior a 0,95 como huevos, carne, algunos productos lácteos, pastas frescas, frutas y verduras. El medio está diseñado para suprimir el crecimiento colonial de moldes "esparcidores" y, al hacerlo, permite un desempeño más fácil de la técnica de recuento de colonias en levaduras y mohos.

El uso del agente antifúngico, Dichloran, restringe la propagación de hongos mucoracáceos y restringe el tamaño de la colonia de otros géneros. El rosa de Bengala también ayuda a reducir el tamaño de las colonias y es selectivo contra las bacterias. La selectividad adicional contra el crecimiento bacteriano se logra a través del bajo pH del medio y la incorporación del antibiótico cloranfenicol termoestable. La glucosa se incorpora como la fuente de carbohidratos fermentables, una digestión enzimática de tejidos animales y vegetales que proporciona las vitaminas esenciales, minerales, aminoácidos, nitrógeno y carbono, y cloruro de sodio que proporcionan un efecto de equilibrio osmótico. Este medio cumple con los requisitos de rendimiento y formulación de la ISO 21527-1: 2008.

3.4.3.4 AGAR GLICEROL DICLORAN (DG-18)

Es un medio selectivo recomendado para la enumeración de levaduras osmofílicas viables y mohos xerófilos en alimentos o productos de alimentación animal con una actividad de agua inferior o igual a 0,95. Esto incluye alimentos como frutos secos, mermeladas, pasteles, carnes secas, pescado salado, cereales, harinas, frutos secos, especias, condimentos y algunos alimentos para animales. Este medio no es adecuado para el examen de productos deshidratados con una actividad de agua superior a 0,95.

La reducción de la actividad del agua en este medio se consigue mediante la adición de glicerol aproximadamente al 18% y esto es muy importante ya que muchas levaduras y mohos requieren poca actividad de agua para mejorar el crecimiento y desarrollo de colonias.

El medio también contiene el agente antifúngico diclorán, el cual restringe la propagación de hongos mucoraceos y restringe el tamaño de la colonia de otros géneros haciendo que el recuento de colonias sea una tarea más fácil.

La selectividad adicional contra el crecimiento bacteriano se logra mediante la incorporación del antibiótico termoestable Cloranfenicol. La glucosa se incorpora como fuente de carbohidratos fermentables, con caseína de digestión enzimática que aporta las vitaminas, minerales, aminoácidos, nitrógeno y carbono esenciales (Beuchat *et al.*, 2001).

3.4.3.5 EXTRACTO DE LEVADURA DEXTROSA CLORANFENICOL –AGAR

Es un medio selectivo para el recuento de levaduras y mohos en la leche y otros productos lácteos, y no está diseñado para su uso en el diagnóstico de enfermedades u otras condiciones en humanos (Engel, 1982).

3.4.4 CALIDAD DEL AGUA

La calidad del agua se define en función de un conjunto de características variables microbiológicas y fisicoquímicas, así como de sus valores de aceptación o de rechazo. El agua de consumo inocua, no ocasiona ningún riesgo significativo para la salud cuando se consume durante toda una vida, teniendo en cuenta las diferentes vulnerabilidades que pueden presentar las personas en las distintas etapas de su vida.

Las personas que presentan mayor riesgo de contraer enfermedades transmitidas por el agua son los lactantes y los niños de corta edad, las personas debilitadas o que viven en condiciones antihigiénicas y los ancianos. El agua potable es adecuada para todos los usos domésticos habituales, incluida la higiene personal (OMS, 2006).

Para el año 2020, se reportaron 884.545 casos de enfermedad diarreica aguda (EDA) en Colombia (Instituto Nacional de Salud, 2020). A nivel mundial, se calculan 2.000 muertes diarias por enfermedades diarreicas. La mayor parte, cerca de 1.800 muertes, están relacionadas con el agua, el saneamiento y la higiene (UNICEF, 2000).

3.4.4.1 DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, COLIFORMES FECALES Y *Escherichia coli* POR LA TÉCNICA DE DILUCIONES EN TUBO MÚLTIPLE (NMP)

La determinación de microorganismos Coliformes totales por el método del número más probable (NMP), se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas al incubarlos a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas, utilizando un medio de cultivo que contenga sales biliares. Esta determinación consta de dos fases, la fase presuntiva y la fase confirmativa. En la fase presuntiva, el medio de cultivo que se utiliza es el caldo lauril sulfato de sodio el cual permite la recuperación de los microorganismos que se encuentren presentes en la muestra y que sean capaces de utilizar a la lactosa

como fuente de carbono. Durante la fase confirmativa se emplea como medio de cultivo el caldo lactosado bilis verde brillante, el cual es selectivo y solo permite el desarrollo de aquellos microorganismos capaces de tolerar tanto las sales biliares como el verde brillante. La determinación del número más probable de Coliformes fecales se realiza a partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva y se fundamenta en la capacidad de las bacterias para fermentar la lactosa y producir gas cuando son incubados a una temperatura de $44.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 24 a 48 horas. La búsqueda de *Escherichia coli* se realiza a partir de los tubos positivos de caldo EC, los cuales se siembran por agotamiento en medios selectivos y diferenciales (Agar Mac Conkey, Agar eosina azul de metileno) y posteriormente realizando las pruebas bioquímicas básicas (IMViC) a las colonias típicas (Kornacki y Johnson, 2001)

3.4.4.2 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL AGUA

En el proceso de abastecimiento del agua, pueden surgir causas que predisponen el ingreso y multiplicación de microorganismos a partir de distintas fuentes como: las conexiones cruzadas, retrosifonaje, rotura de las tuberías, cámaras de bombeo, surtidores, reservorios de distribución, tendido de nuevas tuberías o reparaciones o mantenimiento irregular de estas instalaciones. El principal riesgo de contaminación del agua en la red de distribución es la contaminación con materia fecal por infiltraciones y debido a la presencia de sedimentos en el fondo de las tuberías que favorecen la colonización de microorganismos (Craun *et al.*, 2010).

Las características microbiológicas del agua para consumo humano deben enmarcarse dentro de los valores máximos aceptables desde el punto de vista microbiológico, los cuales son establecidos en la Resolución MPS 2115 de 2007 y se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Características microbiológicas del agua potable.

Técnicas utilizadas	Coliformes totales	<i>Escherichia coli</i>
Filtración por membrana	0 UFC/100 cm ³	0 UFC/100 cm ³
Enzima sustrato	< de 1 microorganismo en 100 cm ³	< de 1 microorganismo en 100 cm ³
Sustrato definido	0 microorganismos en 100 cm ³	0 microorganismos en 100 cm ³
Presencia – Ausencia	Ausencia en 100 cm ³	Ausencia en 100 cm ³

Fuente: Resolución MPS 2115, 2007.

El valor aceptable para *Giardia* es de cero (0) Quistes y para *Cryptosporidium* debe ser de cero (0) Ooquistes por volumen fijado según la metodología aplicada. Las técnicas y metodologías de análisis para estos microorganismos deben ser validadas por el Instituto Nacional de Salud (INS) o revalidadas por éste con base en documentos soporte de organismos internacionales que presenten los solicitantes (Resolución MPS 2115, 2007).

3.4.5 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS ALIMENTOS

Desde la antigüedad se sabe que los alimentos son un excelente transmisor de enfermedades infecciosas. Incluso hoy en día, a pesar de que existe mayor información acerca de los microorganismos y las modalidades de infectarnos con ellos, aun así, la transmisión de estos, mediante alimentos es un gran problema. El análisis microbiológico de alimentos no tiene carácter preventivo, sino que simplemente es una inspección que permite valorar la carga microbiana. Por tanto, no se puede lograr un aumento de la calidad microbiológica mediante el análisis microbiológico sino que lo que hay que hacer es determinar cuáles son los puntos de riesgo de contaminación o multiplicación microbiana y evitarlos siguiendo un código estricto de Buenas prácticas de manufactura (BPM) y distribución del alimento. La calidad es el grado de excelencia que posee un producto. Un producto será de buena calidad cuando cubra los requisitos establecidos por el

cliente, reúna las características esperadas por los consumidores, se acoja a la legislación vigente e incorpore a lo largo del tiempo todas las nuevas y cambiantes exigencias (Bayona, 2009).

Durante el 2020, se reportaron 128 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos con criterios de notificación inmediata en 30 entidades territoriales de salud, con 2.204 casos involucrados, siendo Antioquia, Cali y Bogotá quienes aportaron el mayor número de brotes (Instituto Nacional de Salud, 2020).

3.4.5.1 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETA)

Las ETAs constituyen uno de los problemas graves de salud pública en todos los niveles, desde los países en vía de desarrollo hasta los países desarrollados, siendo una de las causas de disminución de productividad para países, empresas y familias con grandes repercusiones a nivel socioeconómico. A nivel mundial, son un causante principal de morbilidad y mortalidad en personas que habitan en subregiones de ingresos bajos, de escasos recursos sanitarios e insuficientes sistemas de saneamiento, además los niños menores de 5 años son los más perjudicados. Las ETAs son producto de la ingesta de alimentos o agua contaminada con bacterias, parásitos, plaguicidas o metales pesados en cantidades que perjudican la salud de los consumidores de manera aguda o crónica, a escala personal o de un grupo de personas. La contaminación de los alimentos es una consecuencia directa de las deficiencias sanitarias durante su proceso de elaboración, manipulación, transporte, almacenamiento y las condiciones en que son suministrados al consumidor. Los microorganismos provenientes de diferentes fuentes de contaminación, son transferidos a la superficie de los alimentos donde encuentran los nutrientes necesarios para proliferar hasta títulos de 10^2 - 10^5 UFC/cm² (Raftari *et al.*, 2009).

Según la Organización Mundial de la Salud, existen 250 tipos de enfermedades transmitidas por alimentos que se consolidan como un problema de salud pública, capaces de afectar la productividad económica de la sociedad y generar altos costos a los servicios de salud (Helms *et al.*, 2006).

3.4.6 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS COSMÉTICOS

El aseguramiento de la calidad, en especial de la calidad microbiológica de los cosméticos, es de relevante importancia, debido a que se ha demostrado que microorganismos contaminantes como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Candida albicans*, ocasionan diferentes tipos de patologías en la piel a sus consumidores afectando así el prestigio del país productor y sus industrias. Mediante la normatividad y legislación, los productores, países de interés, entre otros; estandarizan los parámetros de cumplimiento, de acuerdo a sus intereses de calidad y en general de desarrollo de los productos; facilitando la apertura y gestión de mercados a nivel local e internacional. En Colombia, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos INVIMA, es el encargado de decretar y hacer cumplir la normatividad y legislación, concerniente para el desarrollo de la producción de los cosméticos (Rodríguez, 2012).

3.4.7 METODOLOGÍAS RÁPIDAS PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS

Las enfermedades transmitidas por alimentos, ocasionadas por microorganismos patógenos, constituyen un grave problema de salud pública a nivel mundial. Los métodos microbiológicos clásicos implican, generalmente, el uso de un apropiado cultivo de preenriquecimiento y enriquecimiento, el aislamiento en medios selectivos y la posterior confirmación mediante pruebas bioquímicas morfológicas y/o serológicas. Todo esto es laborioso, la obtención de resultados puede tomar días o semanas y, adicionalmente, presentan baja sensibilidad. Aunado a ello, se ha demostrado que algunas células bacterianas pueden entrar en un estado viable pero no cultivable (VPNC), debido al procesamiento al que se sujeta el alimento, lo que imposibilita el uso de los métodos de cultivo como herramienta de diagnóstico. Una serie de métodos moleculares alternativos, rápidos y sensibles para la detección, identificación y cuantificación de patógenos transmitidos por alimentos han sido desarrollados para superar estos inconvenientes (Prasad y Sharan, 2009).

3.4.7.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Es la técnica comúnmente usada en el diagnóstico molecular de los diferentes patógenos en alimentos, fue desarrollada hace más de 30 años con el fin de amplificar secuencias de ADN cromosomal y plasmídico específico de cada microorganismo para obtener millones de copias. La PCR minimiza el tiempo de detección e identificación de microorganismos de difícil recuperación, análisis de diferentes tipos de muestras, alta especificidad y sensibilidad con disminución de tiempo para la emisión del resultado, consistente en el paso de días a horas si se compara con los métodos convencionales, por esto, es una alternativa práctica para los laboratorios clínicos e industriales por lo que se toma como una herramienta de diagnóstico en los brotes y control de calidad de los alimentos (Andrade, 2010).

Se han realizado varios estudios utilizando PCR convencional para detectar la presencia de *Arcobacter* spp. en carne aviar, identificación de los genes asociados a la virulencia de las diferentes especies e identificar *E. coli* enterotoxigénica amplificando las enterotoxinas (LT y ST); se ha demostrado el porcentaje de sensibilidad y la rápida obtención de resultados de la PCR; al compararlo con técnicas microbiológicas convencionales, la identificación puede tardar aproximadamente de 5-8 días, en los que sólo se llega a identificar el género del patógeno, pero se siguen desconociendo los genes asociados a su virulencia (Peña, 2014).

3.4.7.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (QPCR)

Esta técnica es una evolución de la PCR en la cual se suprime el paso de evaluación de los productos mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida; combina la amplificación de secuencias específicas de ADN aportada por esta última y fluoróforo con afinidad por el ADN o sondas marcadas con fluorescencia; para el marcaje de estas sondas se han desarrollado diferentes productos químicos, entre los más importantes encontramos el SYBR Green y las sondas de hidrólisis (TaqMan).

Una de las ventajas más grandes que tiene esta variación de la PCR es la realización en condiciones libres de contaminación y poco o nada manipulación del operario en el caso de ser automatizado el ensayo. En comparación con la PCR convencional la qPCR genera resultados cuantitativos en menor tiempo, aporta mayor sensibilidad y seguridad para el operario al evitar el uso de reactivos cancerígenos como el bromuro de etidio; la qPCR según la norma ISO 16140 del 2003 y la Asociación Francesa de Normalización (AFNOR) es un método de cribado alternativo para la evaluación de patógenos en alimentos (Bonilauri, 2016).

En diversos estudios se ha empleado la qPCR para comparar diferentes protocolos de identificación de las especies termófilas de *Campylobacter* spp. de muestras obtenidas en animales y alimentos, identificando y cuantificando las especies *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, también se han analizado alimentos de venta en la vía pública y de plantas de beneficio, encontrando *Salmonella* spp.; demostrando que esta técnica aporta gran sensibilidad y especificidad, además de rapidez en la identificación de patógenos en alimentos y constituye una técnica de gran elección para el análisis de calidad, gracias a la emisión de resultados cuantitativos (Yáñez, 2008).

3.4.7.3 DETECCIÓN DE PATÓGENOS POR PCR – SISTEMA BAX

El sistema BAX está diseñado para la detección y control de patógenos y otros microorganismos en muestras de alimentos, producto acabado, materias primas y muestras ambientales mediante la amplificación de ADN con la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) validado por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales AOAC, la certificación de la Asociación Francesa de Normalización AFNOR y otras agencias reguladoras de todo el mundo.

Este sistema utiliza la tecnología de PCR en tiempo real para reducir el tiempo de procesamiento, lo que ayuda a las empresas de alimentos a tomar decisiones de lanzamiento de productos con rapidez y confianza (Insulab, 2021).

Las imágenes 3 y 4 muestran el funcionamiento del sistema BAX – PCR.

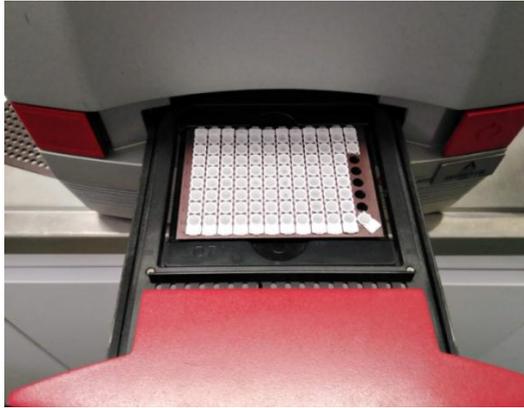


Imagen 3. PCR – Sistema BAX

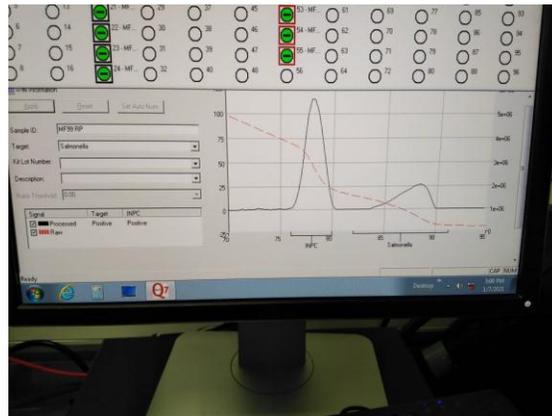


Imagen 4. Archivo del sistema BAX

4. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo los diferentes procesos, se tienen en cuenta las condiciones que solicita el cliente basándose en la normativa para el análisis de su respectivo producto. Si bien, se busca determinar la presencia de microorganismos alterantes, este se puede llevar a cabo por diferentes metodologías.

4.1 USO DE METODOLOGÍAS CONVENCIONALES PARA EVALUAR LA CALIDAD DE LOS ALIMENTOS.

Todos los procesos, van enfocados en facilitar las condiciones de crecimiento de los diferentes microorganismos que pueden estar presentes dentro del producto, y determinar su presencia mediante el uso de recuento en placa. A continuación, se presenta en la siguiente tabla el resumen habitual de estos procesos horizontales que se llevan a cabo dentro del laboratorio. Las técnicas usadas para dar las condiciones de crecimiento están orientadas por la ISO y su adaptación por la norma técnica colombiana (NTC).

Los análisis solicitados y los medios a usar muchas veces pueden variar de acuerdo a la matriz y a las necesidades del cliente, ya que muchos de ellos no sólo se rigen por los análisis pedidos por el Ministerio de Salud, sino por normativas internacionales o de su propio laboratorio. Dicho lo anterior, se hace extenso realizar metodologías de acuerdo a cada matriz y a las necesidades inusuales como la contaminación de un microorganismo característico, por lo tanto, se procede a ser resumida en la siguiente tabla.

Tabla 2. Metodologías convencionales

Microorganismo	Método / Técnica	Temperatura	Tiempo de incubación	Medios de cultivo
Aerobios mesófilos	Recuento en placa ISO 4833-1:2013.	30 °C	48 horas	Standard methods
<i>Salmonella</i> spp.	NTC 4574-1; A/P AOAC edición 23:2019 método 967.26	35 °C	24 horas	Muller Kauffmann, Rappaport vassiliadis, XLD, Hektoen entérico
<i>E. coli</i>	Recuento en placa NTC 4458 y NMP:	45 °C	18-24 horas	TBX – Caldo bilis verde brillante, Caldo Lauril Triptosa-LTB
Coliformes totales	Recuento en placa NTC 4458 y NMP	35 °C	36-48 horas	Caldo bilis verde brillante; caldo lauril triptosa -LTB.
<i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva	Recuento en placa ISO 6888-1: 2003	35 °C	36-48 horas	Baird Parker
<i>Bacillus cereus</i>	Recuento en placa ISO 7932:2004	30 °C	36-48 horas	MYP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P/A Standard methods edición 23:2017 9213-E	42 °C	72 horas	Agar Cetrimide
Mohos y levaduras	Recuento en placa ISO 21527-1:2008	25°C	5 días	DRBC DG-18

4.1.1 SISTEMA VITEK

El sistema VITEK es un sistema automatizado de identificación bacteriana y estudio de sensibilidad antimicrobiana. La identificación de las bacterias se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas. La sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo en forma similar a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por NCCLS¹. Este sistema se ha empleado para el estudio de cepas clínicamente significativas aisladas de muestras clínicas u otras fuentes como alimentos y agua (Romeu *et al.*, 2010).

El uso de este equipo en la empresa está sujeto a la solicitud del cliente para la confirmación del microorganismo. El correcto uso de las tarjetas correspondientes a cada microorganismo para cada muestra asegura un resultado satisfactorio. Cada tarjeta contiene alrededor de 47 pruebas bioquímicas fluorescentes entre las cuáles se encuentra la asimilación de carbohidratos de ácidos orgánicos, detección de oxidasas y arilamididasas. Una vez el microorganismo esté aislado en un medio nutritivo, se realiza un Mcfarland de 0,5 para introducirlo dentro de una tarjeta de lectura al equipo y evaluar así la sensibilidad del resultado arrojado por el software.

4.2 USO DE METODOLOGÍAS RÁPIDAS

Están enfocadas en la PCR, un sistema semi-automatizado para determinar la presencia o confirmación de un microorganismo en cuestión.

4.2.1 DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS SEROGRUPOS MÁS COMUNES DE *Escherichia coli* RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE TOXINA SHIGA MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA PCR BAX® Q7

DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS SEROGRUPOS MÁS COMUNES DE *Escherichia coli* RELACIONADOS CON LA PRODUCCIÓN DE TOXINA SHIGA MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA PCR BAX Q7

1. Si el cliente lo requiere para su confirmación se evalúa la calidad de los alimentos que tengan mayor probabilidad de estar contaminados por esta bacteria, tales como: cortes de carne en diferentes presentaciones bovina y porcina

2. Mediante el sistema bax, se amplifica aquellos segmentos de ADN estables que poco son alterados a lo largo del crecimiento de la bacteria y se determina su presencia

3. Los serogrupos de la especie *Escherichia coli* que son evaluados en este laboratorio son los productores de la toxina shiga (STEC) los cuales se encuentran: O26, O111, O103, O145, O45, O121

4. Una vez realizado el montaje de 375 g en 1.5 L con caldo enriquecido de MP se incuba a 41°C +/- 1°C durante 15-24 horas

5. Al momento de realizar el montaje se calientan las planchas correspondientes a las temperaturas de 37°C y 95°C, seguido de esto se enciende el equipo Q7 y el sistema bax en el computador

6. Se organizan los tubos cluster de acuerdo a la forma como se desea visualizar las muestras en el archivo del bastidor.

7. Se debe preparar la solución de lisis agregando 150 µL de proteasa a una botella de 12ml de tampón de lisis. importante mantener la proporción si se requiere muy poca cantidad de la solución.

8. Tomar 200 µL de la anterior solución y depositarla en un tubo cluster. Adicionar posteriormente 20 µL del caldo de enriquecimiento que contiene la muestra a cada tubo cluster.

9. Una vez el volumen de la muestra se encuentra sumergida en la solución lisis, se homogeniza cuidadosamente con la micropipeta.

10. Se procede a calentar cada uno de los tubos cluster en la plancha de 37°C durante 20 min. pasado este tiempo se transfieren los tubos a la plancha de calentamiento de 95°C durante 10 minutos.

11. Seguido a esto, los tubos se colocan en la plancha de enfriamiento durante un tiempo aproximado de 5 min.

12. Si se monta el blanco, como control negativo, este deberá ser el caldo de enriquecimiento que se usa comúnmente.

13. Una vez los tubos estén acondicionados, se realiza la hidratación de las pastillas. primero se debe colocar un tubo de PCR en el bloque de enfriamiento y cubrir con el soporte para tubos PCR.

14. Colocar los tubos de PCR de acuerdo con el archivo de bastidor

15. Retirar las tapas de los tubos con ayuda de la herramienta decapping.

16. Transferir 30 µL de lisado a los tubos de PCR, y luego sellar con la tapa óptica plana lo más pronto posible. paralelamente iniciar el proceso de calentamiento en el termociclador para que este listo para la corrida.

17. Ingresar el bastidor de tubos de PCR a los diferentes pozos enmarcados dentro del cajón del termociclador.

18. Seguido a esto, se da la orden mediante el sistema dentro del computador para la corrida de PCR. Para este caso el proceso dura una hora aproximadamente.

19. Una vez se arroja los resultados, se tiene en cuenta las siguientes consideraciones:

19.1. En el sistema, los resultados arrojados son cualitativos.

19.2. Permite visualizar las gráficas características del comportamiento de cada microorganismo.

20. Los resultados de los pocillos presentados en la pantalla del computador de color rojo con un signo más, se catalogan como positivos presuntivos, mientras que los de color verde y un signo menos se catalogan como negativos para la presencia del microorganismo en cuestión.

21. Si el cliente desea realizar el proceso para confirmar un resultado presuntivo, se le realiza el mismo procedimiento anterior a la muestra y se transfieren los 30 μ L de lisado a los 2 tubos de PCR que contienen las pastillas del panel 1 y 2 para reconocer los 6 serogrupos.



22. Se realiza la corrida del PCR en tiempo real y se evalúan los resultados obtenidos.

Fuente: Oxoid, 2018

4.2.2 DETECCIÓN MOLECULAR DEL SEROTIPO *Escherichia coli* O157:H7 MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA PCR BAX Q7 EVALUADO POR LA AOAC

DETECCIÓN MOLECULAR DEL SEROTIPO *Escherichia coli* O157:H7 MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA PCR BAX Q7 EVALUADO POR LA AOAC

1. Al igual que los análisis para los serogrupos, los clientes solicitan realizar el proceso en los siguientes productos: cortes de carne en diferentes presentaciones bovina y porcina

2. Mediante el sistema bax, se amplifica aquellos segmentos de ADN estables que poco son alterados a lo largo del crecimiento de la bacteria y se determina su presencia

3. Una vez realizado el montaje, tomar 375g de la muestra en 1.5 L con caldo enriquecido de MP se incuba a 41°C +/- 1°C durante 15-24 horas

4. En caso de ser vegetales varia el volumen de la toma de la muestra 25g en 225 ml de MP.

5. Al momento de realizar el montaje se calientan las placas correspondientes a las temperaturas de 37°C y 95°C, seguido de esto se enciende el equipo Q7 y el sistema bax en el computador

6. Se organiza los tubos cluster de acuerdo a la forma como se desea visualizar las muestras en el archivo del bastidor.

7. Se debe preparar la solución de lisis agregando 150 µL de proteasa a una botella que contiene 12 ml de tampón de lisis. En el caso que no se requiera toda la cantidad se debe preparar proporcional a la dilución inicial

8. Tomar 200µL de la anterior solución y depositarla en un tubo cluster. Adicionar posteriormente 20 µL del caldo de enriquecimiento que contiene la muestra a cada tubo cluster.

9. Una vez el volumen de la muestra se encuentra sumergida en la solución lisis, se homogeniza cuidadosamente con la micropipeta.

10. Se procede a calentar cada uno de los tubos cluster en la plancha de 37°C durante 20 min. pasado este tiempo se tranfiere los tubos a la plancha de calentamiento de 95°C durante 10 minutos.

11. Seguido a esto, los tubos se colocan en la plancha de enfriamiento durante un tiempo aproximado de 5 min.

12. Si se monta el blanco, como control negativo, este deberá ser el caldo de enriquecimiento que se usa comunmente.

13. Una vez los tubos estén acondicionados, se realiza la hidratación de las pastillas. Primero se debe colocar un tubo de PCR en el bloque de enfriamiento y cubrir con el soporte para tubos PCR.

14. Colocar los tubos de PCR de acuerdo con el archivo de bastidor

15. Retirar las tapas de los tubos con ayuda de la herramienta decapping.

16. Transferir 50 µL de lisado a los tubos de PCR, y luego sellar con la tapa óptica plana lo más pronto posible. paralelamente iniciar el proceso de calentamiento en el termociclador para que este listo para la corrida.

17. Ingresar el bastidor de tubos de PCR a los diferentes pozos enmarcados dentro del cajón del termociclador.

18. Seguido a esto, se da la orden mediante el sistema dentro del computador para la corrida de PCR. Para este caso el proceso dura una hora aproximadamente.

19. Los resultados obtenidos de los pocillos se interpretan de igual manera que los otros procedimientos explicados anteriormente mencionados en el sistema bax. rojo con "+" positivo y verde "-" negativo para la presencia del microorganismo.

Fuente: Oxoid, 2018

4.2.3 DETECCIÓN MOLECULAR DE *Listeria monocytogenes* MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA PCR BAX Q7 EVALUADO POR LA AOAC

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Listeria monocytogenes* MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA PCR BAX Q7 EVALUADO POR LA AOAC

1. Para realizar el enriquecimiento y darle las condiciones al microorganismo se toma 25gr de la muestra y se coloca en una bolsa irradiada con filtro; seguido se adiciona 225 ml de caldo LEB
2. Se incuba a una temperatura de 37°C entre un rango de 24-48 horas (varía el tiempo de acuerdo a la muestra a analizar)
3. Pasado el tiempo de incubación de la muestra se realiza el montaje de la primera lisis: manejando los mismos cuidados, se agrega al pocillo 40µL del agente 1 y 10 µL del agente 2.
4. Se le adiciona 500µL de la muestra al pocillo y se tapan
5. Calentar los tubos en la plancha de 30 min a una temperatura de 37°C.
6. Segunda lisis: Tomar 200µL de la solución Buffer + proteasa en un nuevo pocillo
7. Agregar a este nuevo pocillo, 5µL de la lisis anterior una vez haya finalizado el tiempo de desnaturalización del ADN.
8. Llevar los anteriores pocillos a 55°C durante 30 minutos.

9. Una vez finalizado el tiempo, llevar los tubos a la plancha de calentamiento de 95°C durante 10 min



10. Una vez finalizado este proceso, refrigerar el lisado en el bloque de enfriamiento por un tiempo de 5 minutos



11. Para realizar la hidratación de pastillas de PCR: transferir 30 µL del lisado a los tubos de PCR y colocar tapas ópticas nuevas correctamente.



12. Llevar los pocillos de PCR en los pozos en el cajón, verificando la posición correctamente en comparación con el archivo creado en el sistema.



13. Realizar la corrida y emitir el resultado correspondiente. .

Fuente: Oxoid, 2018

4.2.4 DETECCIÓN MOLECULAR DE *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* y *Campylobacter coli* MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA PCR BAX Q7 EVALUADO

DETECCIÓN MOLECULAR DE *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* y *Campylobacter coli* MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA PCR BAX Q7

1. Para realizar el enriquecimiento y darle las condiciones al microorganismo, tomar 25 g de la muestra y depositarla en una bolsa irradiada con filtro; adicionar 225 ml de caldo BOLTON a una concentración sencilla de enriquecimiento para el caso de muestras crudas.

2. Incubar a una temperatura de 42°C entre un rango de 24-48 horas en una cámara de anaerobiosis adicionando el sobre de microaerofilia.

3. Tomar 200µL de solución buffer + proteasa y depositarlos en un tubo cluster adicionando posteriormente 5µL del caldo de enriquecimiento que contiene la muestra..

4. Calentar cada uno de los tubos cluster en la plancha de 37°C durante 20 min. Pasado este tiempo, transferir los tubos a la plancha de calentamiento de 95°C durante 10 minutos.

5. Refrigerar el lisado en el bloque de enfriamiento por un tiempo de 5 minutos

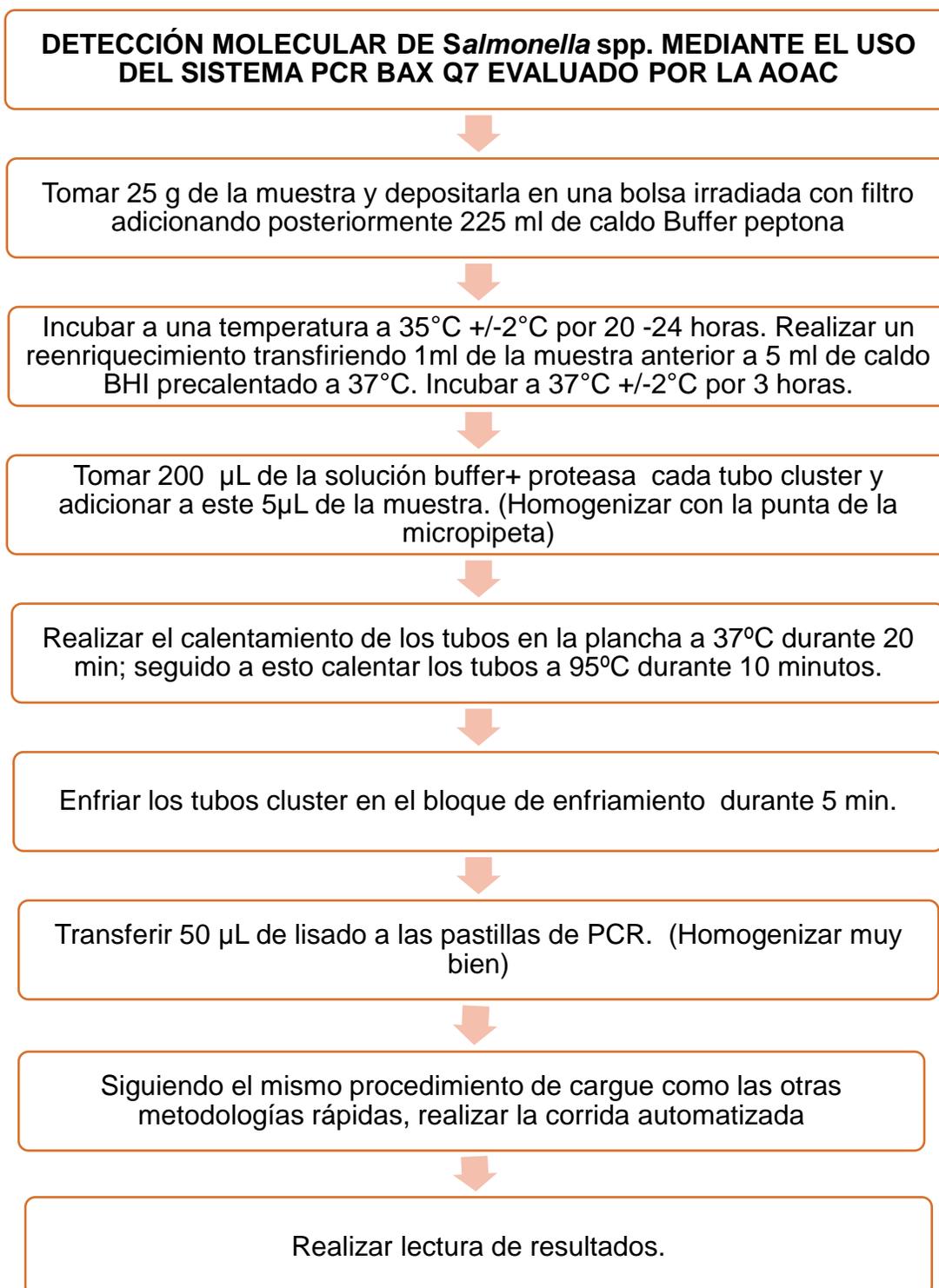
6. Para hidratar las pastillas de PCR, adicionar 30µL del lisado del ADN anterior.

7. Colocar el bastidor de tubos de PCR en los pozos en el cajón, y comenzar la corrida.

8. Evaluar los resultados, **positivo**: color rojo con un signo positivo en la mitad. Este saldrá cuando esté presente algunas de las tres especies de *Campylobacter*.
Negativo: Si ninguna de las tres especies de *Campylobacter* está presente en la muestra, el pozo es de color verde con un signo negativo..

Fuente: Oxoid, 2018

4.2.5 DETECCIÓN MOLECULAR DE *Salmonella* spp. MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA PCR BAX Q7 EVALUADO POR LA AOAC



Fuente: Oxoid, 2018

4.3 ANÁLISIS DE AGUAS POTABLES O TRATADAS Y DE RIEGO

4.3.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS POTABLES Y ENVASADAS POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Análisis microbiológico de aguas potables y envasadas por el método de filtración por membrana

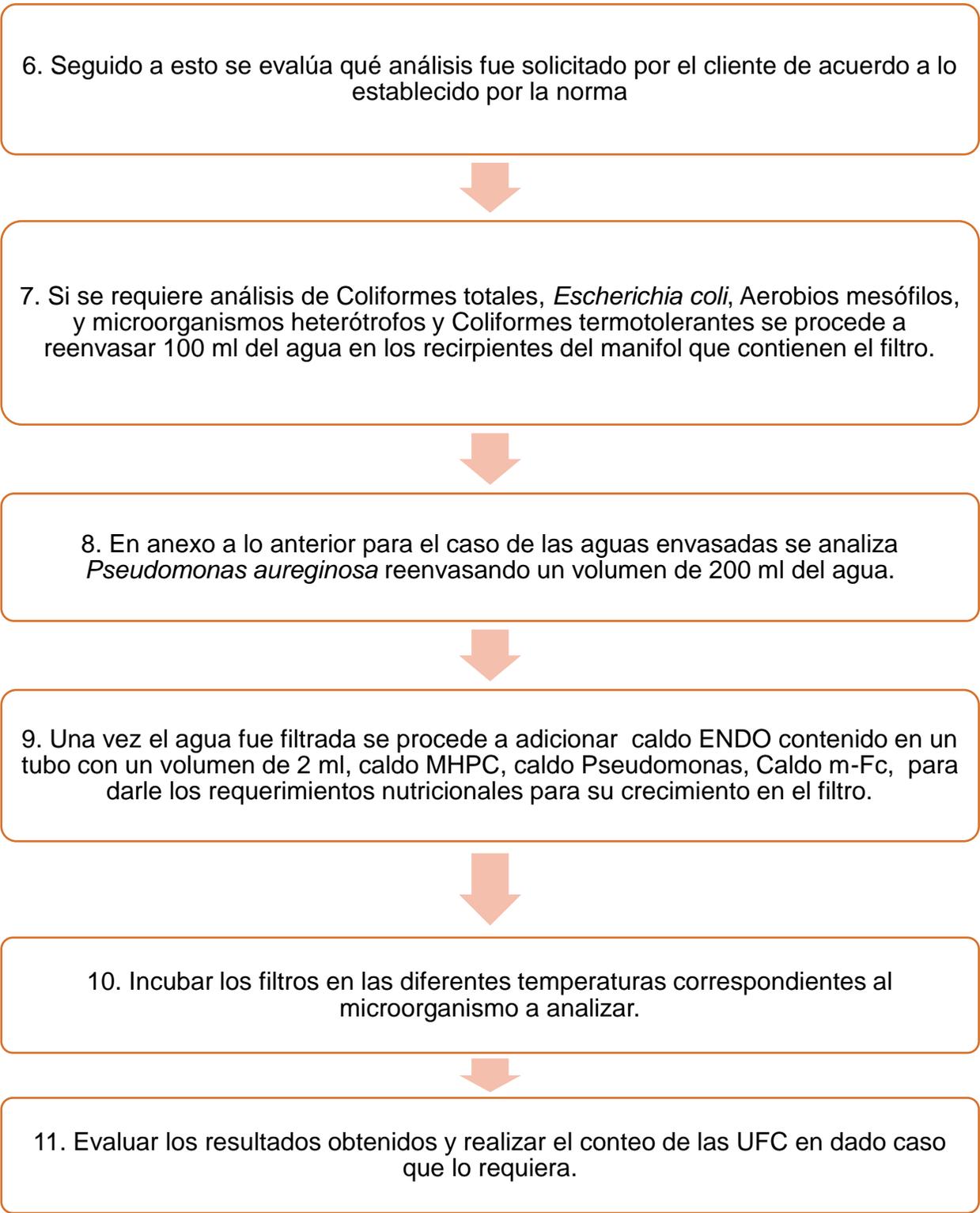
1. Analizar y ejecutar los procesos microbiológicos para la inspección de aguas potables, envasadas, de piscina teniendo en cuenta la Resolución 2115 del 2007 y el Decreto 1575 del 2007 dispuesto por el Ministerio de Protección Social

2. El área encargada de la toma de muestras y recolecta de los productos, realiza este procedimiento manteniendo todas las normas de seguridad. Siendo esta una agua envasada, o agua potable tomadas de diferentes puntos.

3. Los puntos de toma de agua potable dada por los diferentes clientes, se envasan en bolsas con tiosulfato de sodio al 0,1% con una cantidad no menor a los 300 ml.

4. De lo anterior, además de las aguas envasadas se mantienen refrigeradas a una temperatura de 4°C mientras se realiza el procedimiento.

5. Una vez el área se encuentra montada, se procede a limpiar con virex la bolsa que contiene el agua para evitar contaminación cruzada.



Fuente: NTC 4772, 2008.

4.3.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS DE RIEGO MEDIANTE EL MÉTODO DE NMP.

Análisis microbiológico de aguas de riego mediante el método de NMP.

1. Para garantizar la calidad de las aguas de riego según el Decreto 1594 del año 1984 dispuesto por el MinAgricultura se realiza el proceso mediante la técnica del NMP debido a la cantidad de sólidos y turbiedad que presenta.

2. Estas deberán ser refrigeradas a una temperatura de 4°C si requieren ser almacenadas

3. Una vez el área se encuentra montada, se procede a limpiar con virex la bolsa que contiene el agua para evitar contaminación cruzada.

4. Seguido a esto, se toma 1ml del volumen del agua de riego para cada uno de los 6 tubos de ensayo que contienen 9 ml de agua dilución y se homogeniza bien.

5. A partir del tubo número 6 se realiza la segunda dilución. Se dispensa 1 ml de este a 6 nuevos tubos con agua dilución (9 ml) y se repite este proceso para realizar la tercera dilución.

6. Finalmente los tubos que se encuentran enmarcados en cada dilución que no se usaron (5 por cada dilución) se dispensan completamente en los respectivos tubos de caldo lauril sencillo o caldo billis verde brillante y se enmarcan de acuerdo a la dilución que fue agregada.

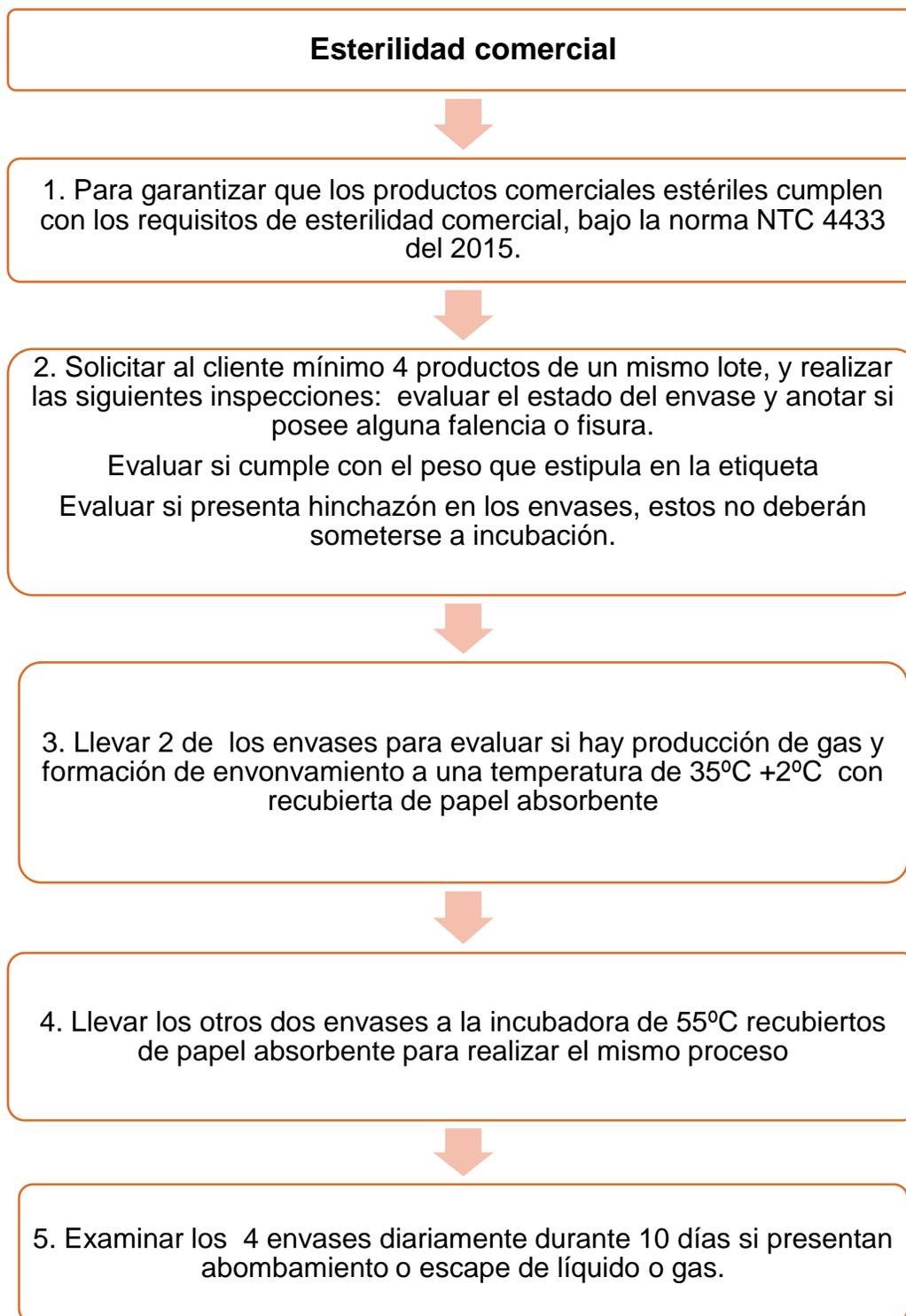
7. Se incuban a 35°C, y a 45°C durante 24 horas.

8. Observar la producción de gas mediante la campana de Durham en los tubos incubados a 35°C para determinar Coliformes totales y considerar como Coliformes fecales, los que demuestren positividad tanto en la producción de gas y la formación de indol tras la adición de unas gotas de reactivo de Kovac's (halo rojo).

Fuente: NTC 4772, 2008.

4.4 METODOLOGÍAS PARA ESTERILIDAD COMERCIAL Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS.

4.4.1 ÁREA DE ANÁLISIS ESPECIALES- ESTERILIDAD COMERCIAL MEDIANTE LA NTC 4433 DEL 2015



6. En caso de presentar algún cambio durante estos días, evaluar inmediatamente; de no ser así abrir el envase en el tiempo estipulado en la cabina de bioseguridad en un cuarto estéril, abrirlo de manera aséptica.



7. Registrar los cambios si se encuentran olores extraños o fuera del olor característico del producto, a su vez mezclar el producto para permitir que los microorganismos si se encuentran en el producto puedan ser tomados.



8. Antes de realizar la siembra y la toma de la muestra, realizar un control biológico ambiental mientras se desarrolla el proceso, con el fin de evaluar que el área de siembra está en óptimas condiciones.



9. Para realizar la inoculación e incubación tomar 1-2 g de muestra del núcleo y superficie en caso de ser sólida.



10. La muestra se siembra en 4 tubos con caldo BHI con almidón en anaerobiosis y aerobiosis a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas. Del mismo modo realizar el proceso con las muestras incubadas a la temperatura de 55°C e incubar en condiciones anaerobias y aerobias a $55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas.



11. Pasado el tiempo de incubación realizar frotis y tinción de Gram a todos los tubos. De igual manera realizar frotis de la cabina, superficie, puntas y medios.



12. Resultados esperados: se considera que el producto está estéril y es satisfactoria cuando en los 8 tubos de anaerobiosis y los 8 tubos de aerobiosis no presenta crecimiento.
En caso contrario, se reporta prueba de esterilidad no satisfactoria.

Fuente: NTC 4433, 2015.

4.4.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS COSMÉTICOS SIGUIENDO LOS PARÁMETROS ESTABLECIDOS EN LA RESOLUCIÓN 2120 DEL 2019 DISPUESTA POR LA COMUNIDAD ANDINA

Análisis microbiológico de productos cosméticos

1. Para garantizar que los productos a analizar poseen buenas prácticas de manufactura se debe verificar su calidad según la norma 2120 del 2019 dispuesta por la comunidad andina, siguiendo los métodos dispuestos por la ISO 22718:2015, ISO 22717:2015, ISO 21149:2015, 21150:2015 y la ISO 18416: 2015.

2. Para el desarrollo de este proceso se debe garantizar un ambiente limpio en una cabina de flujo laminar vertical en un cuarto con presión positiva.

3. En primera medida se realiza la preparación de la muestra, se deposita una suspensión de la muestra y neutralización mediante el uso del caldo que contenga el neutralizante del conservante antimicrobiano.

4. Si la muestra es soluble en agua: 10 ml de la fórmula cosmética en solución caldo Letheen modificado y completar el volumen a 100 ml con el solvente.

5. Importante: la relación siempre se debe mantener en 1:10 para este proceso.

6. A partir de esta dilución madre, realizar las diluciones respectivas para tomar 1 ml de la dilución y sembrar por profundidad en medio TSA e incubar a 32.5 +/- 2.5°C /72 horas



7. Incubar el Lethen modificado a 32.5 +/- 2.5°C /20 horas -70 horas



8. Pasado el tiempo de incubación, hacer lectura del recuento en placa del medio incubado y realizar siembra de los posibles microorganismos patógenos presentes en el caldo Lethen modificado.



9. Pasado el tiempo de incubación del Lethen modificado, determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* tomando una asada al medio agar BP con telurito de potasio más yema de huevo e incubar a 32.5°C +/- 2.5 /24 - 48 horas.



10. **Nota:** Depende de la matriz a analizar se realiza el proceso de determinación de *Candida albicans* por siembra en superficie en agotamiento en sabouraud dextrose con cloranfenicol e incubar 32.5 +/- 2°C/24 -48 horas.



11. Determinación de *Pseudomonas aureginosa* mediante un repique con asa a un medio de cetrimide e incubar a 32.5°C +/-2.5°C/24 - 48 horas.



12. Siguiendo el mismo proceso a partir del cultivo obtenido en el caldo Lethen; determinar la presencia de *Escherichia coli* y realizar el repique con asa en el medio MacConkey e incubar a 32.5°C +/-2.5°C/ 24 -48 horas



13. Analizar los resultados obtenidos, en caso de no presentar crecimiento en ningún microorganismo informar que cumple con la prueba satisfactoriamente y expresar la ausencia del microorganismo.

Fuente: ISO 22718:2015, ISO 22717:2015, ISO 21149:2015, 21150:2015, ISO 18416: 2015.

4.5 EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA MOHOS Y LEVADURAS

Debido a la confidencialidad que maneja la empresa y al flujo constante de muestras con los turnos rotativos de análisis dentro del laboratorio, no fue posible llevar la trazabilidad de un producto en específico, por lo anterior, en función de las necesidades del laboratorio, la coordinadora determinó el trabajo de evaluar el desempeño de la vida útil de los medios de cultivo usados comúnmente en la empresa para el crecimiento de mohos y levaduras en condiciones de almacenamiento de 55°C en medio líquido durante un periodo de seis días.

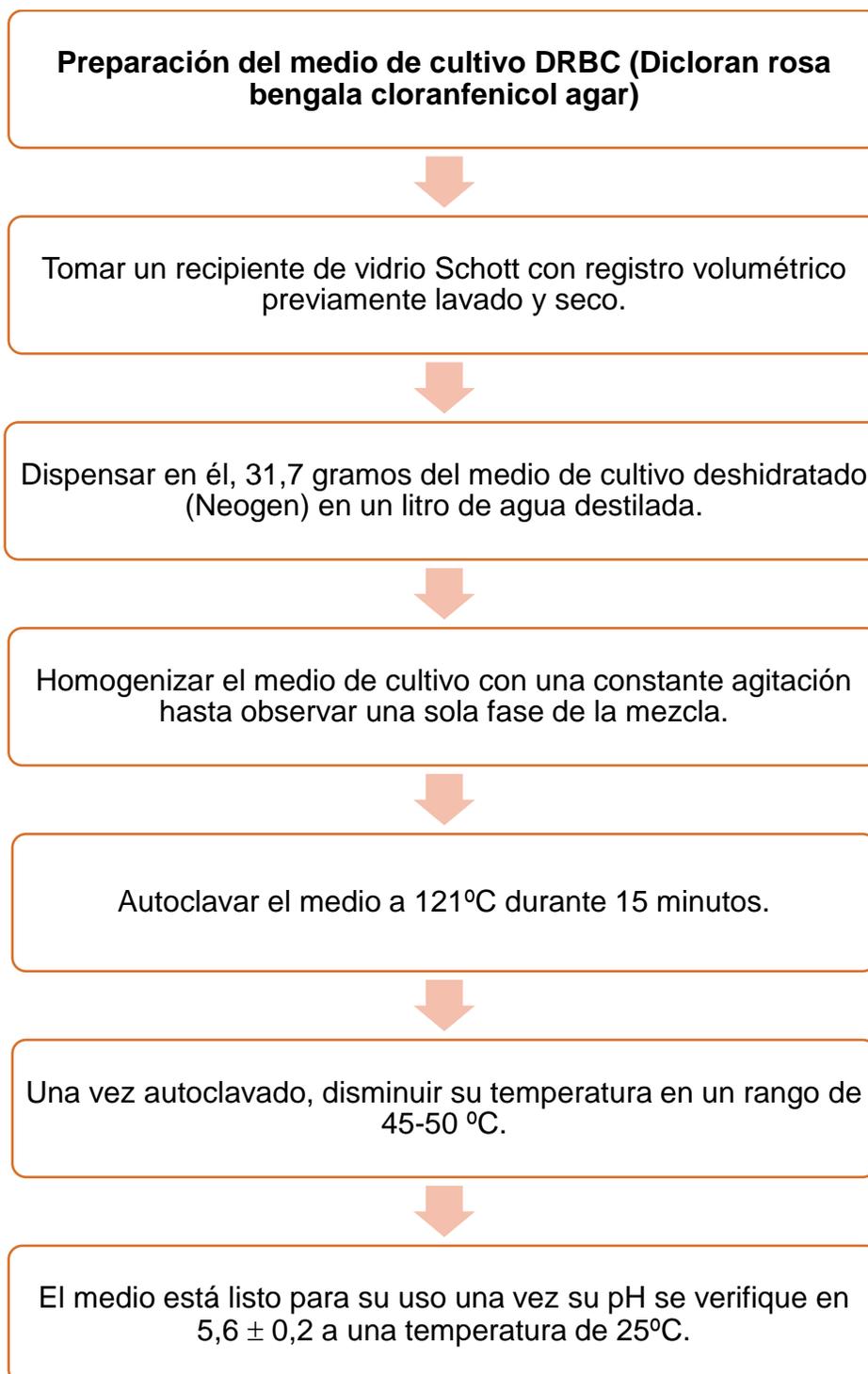
Según la norma ISO 17025 establece que los medios para uso y evaluación de la calidad de los alimentos y demás productos debe mantener ciertos criterios como la recuperación o supervivencia de los microorganismos de interés, es decir PRODUCTIVIDAD, la inhibición de microorganismos de NO interés de una forma cualitativa, es decir SELECTIVIDAD, mantener el estado natural de sus propiedades fisicoquímicas y mantener las características provistas por la casa comercial del medio.

Basándose en la norma ISO 11133:2014 para la evaluación de los medios de cultivo a utilizar en el laboratorio de Microbiología, se debe realizar una validación de la productividad, selectividad y especificidad de los mismos.

Debido a que el laboratorio no cuenta con los datos experimentales con base a la vida útil de estos medios, se aclara que este es el primer proceso que se tendrá como base para evaluar los medios de cultivo usados para mohos y levaduras.

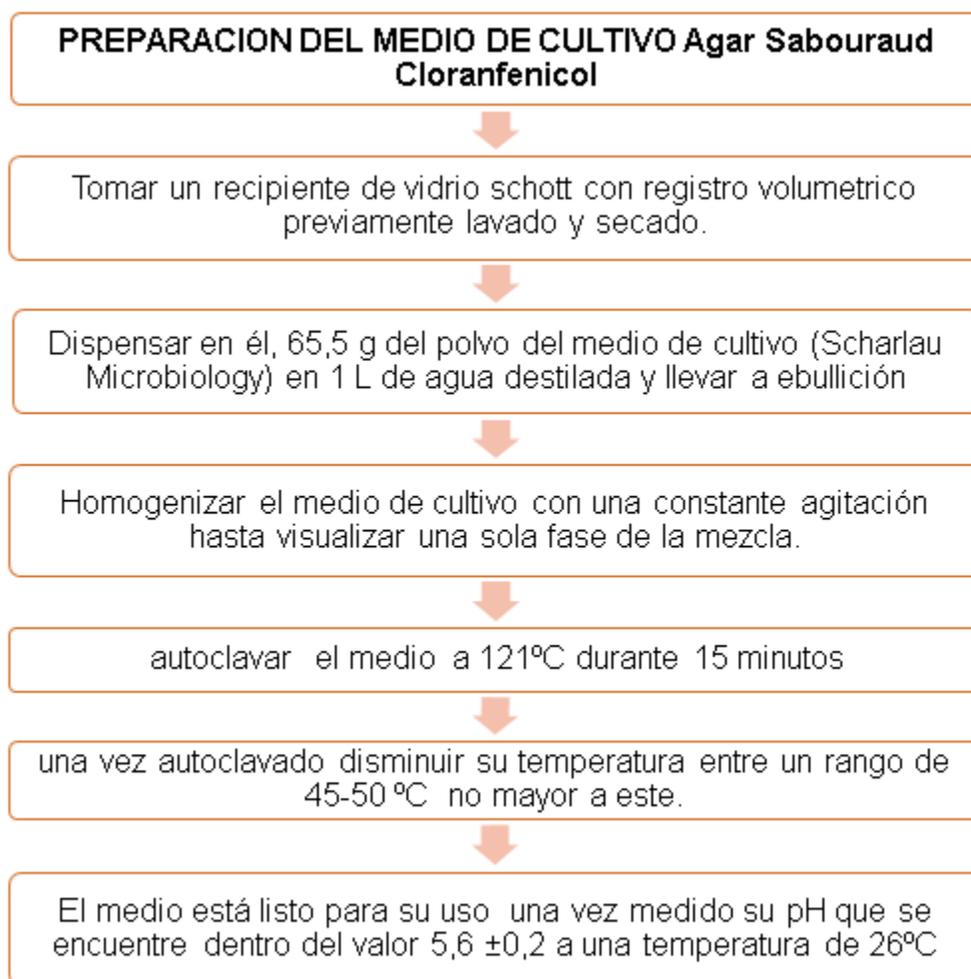
Por este motivo, los valores recolectados actuarán como referencia en unos próximos análisis y a su vez serán los resultados que determinarán la calidad de los medios, las falencias en los procesos analíticos, sistemáticos y los planes de acción que se deberán ejecutar para obtener un mejor resultado en su rendimiento como medio.

4.5.1 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DRBC



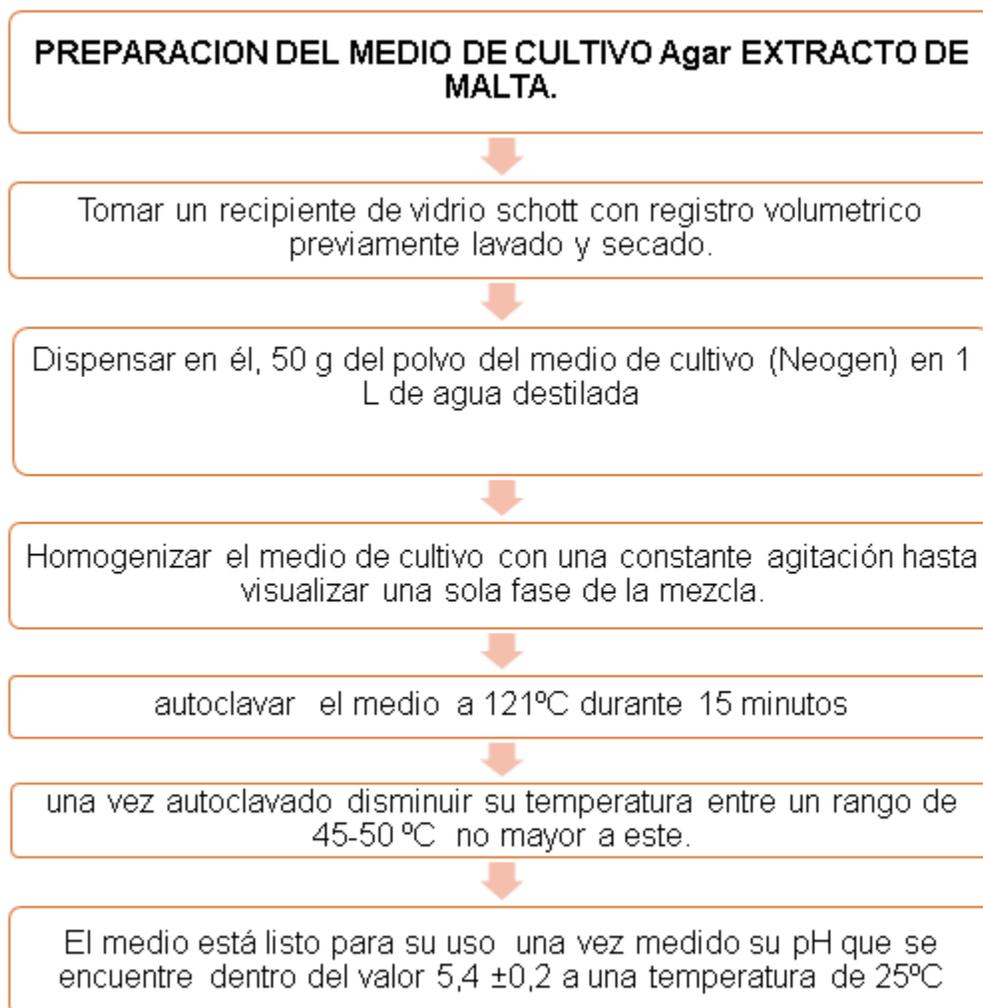
Fuente: Merck, 2010.

4.5.2 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO SABOURAUD CLORANFENICOL



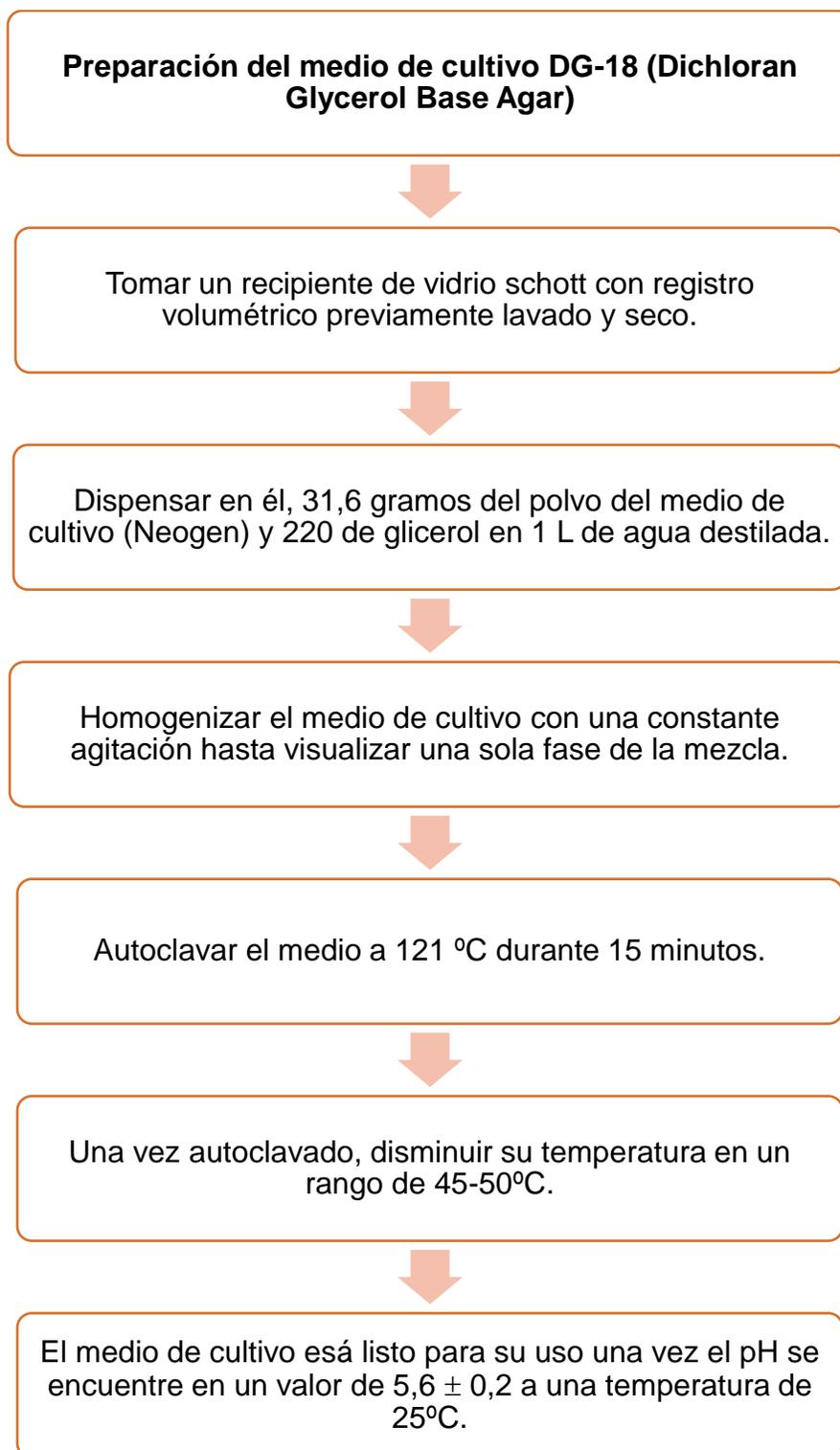
Fuente: Merck, 2010.

4.5.3 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO AGAR EXTRACTO DE MALTA



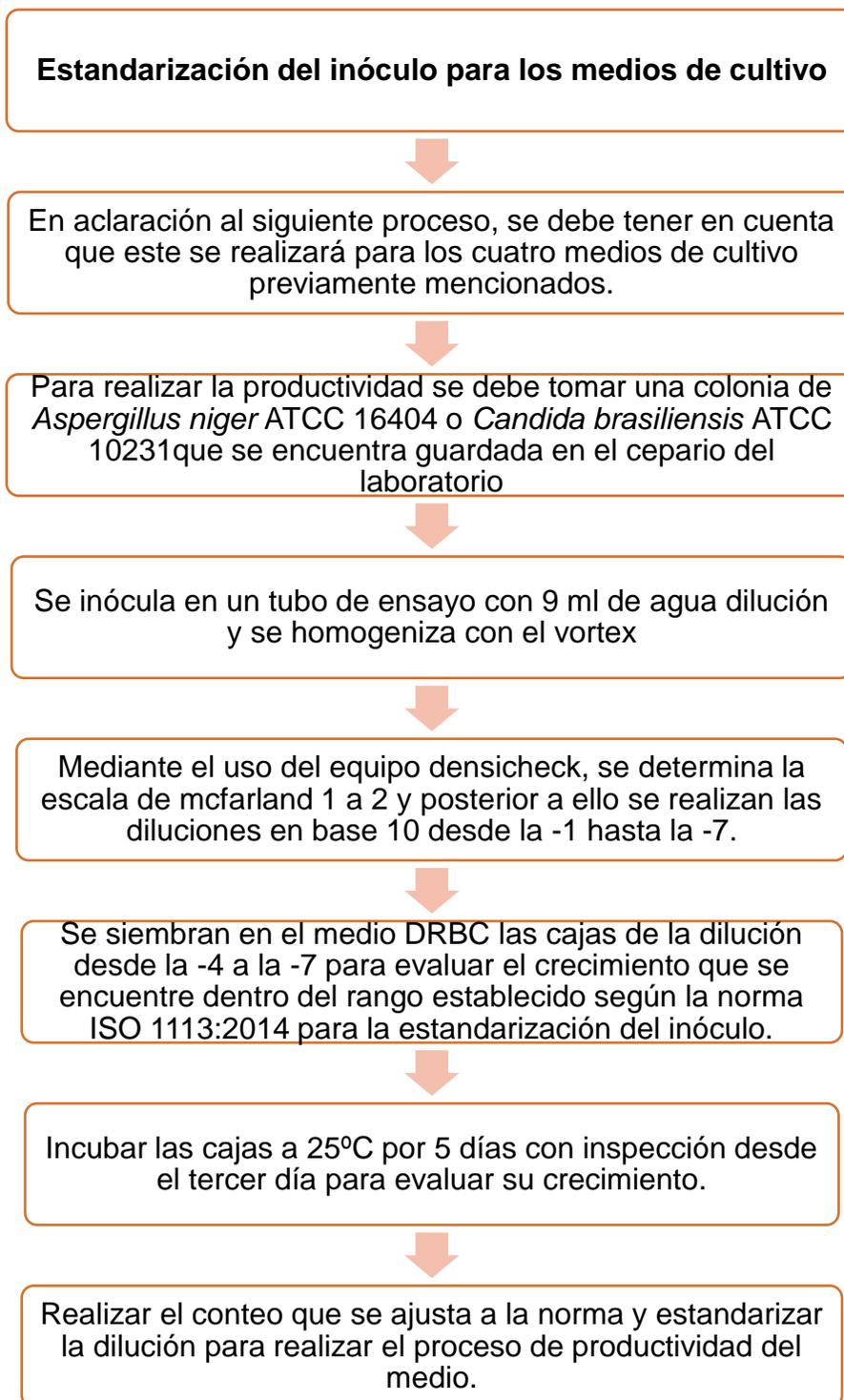
Fuente: Merck, 2010.

4.5.4 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DG 18



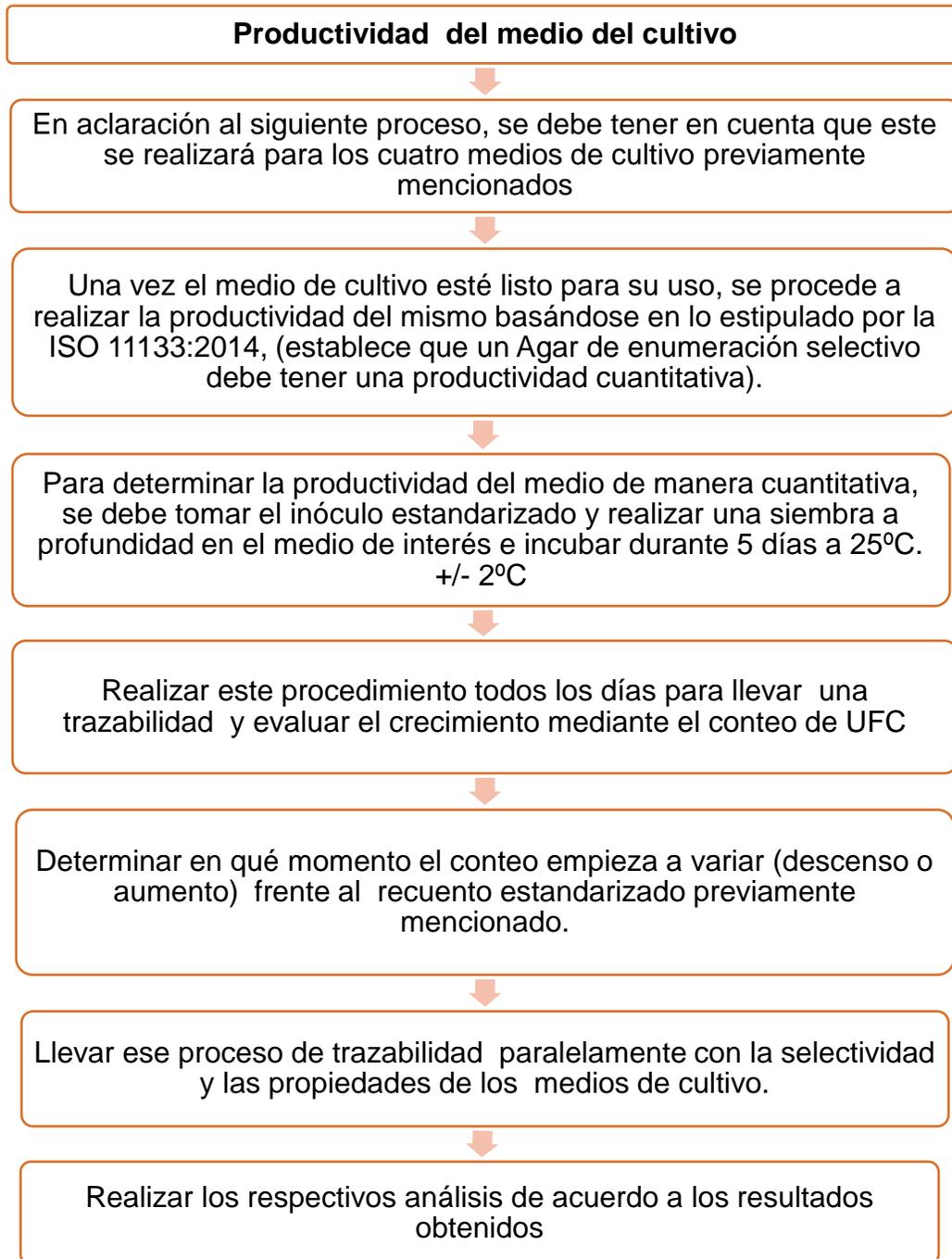
Fuente: Merck, 2010.

4.5.5 ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO



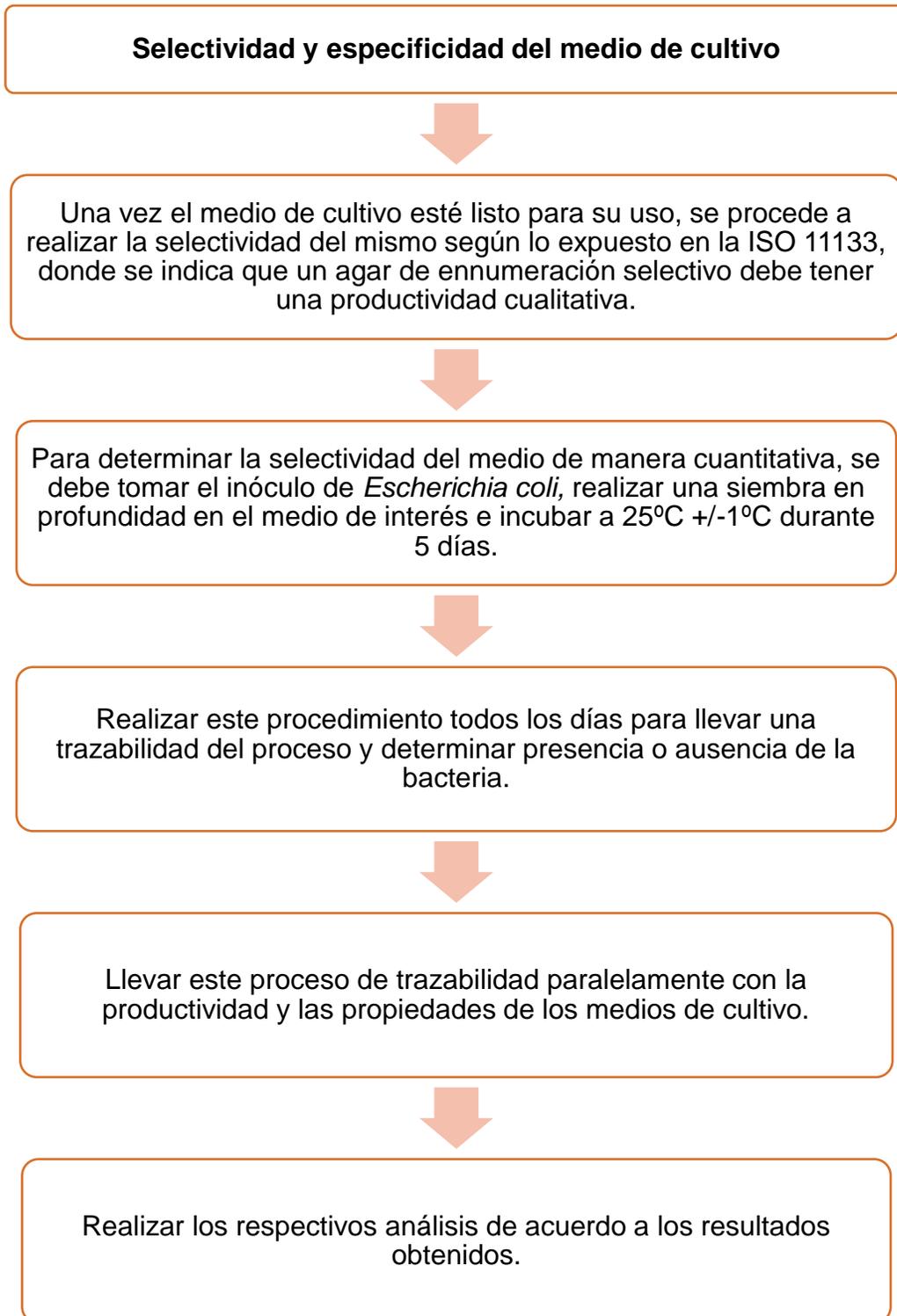
Fuente: ISO 11133:2014

4.5.6 PRODUCTIVIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO



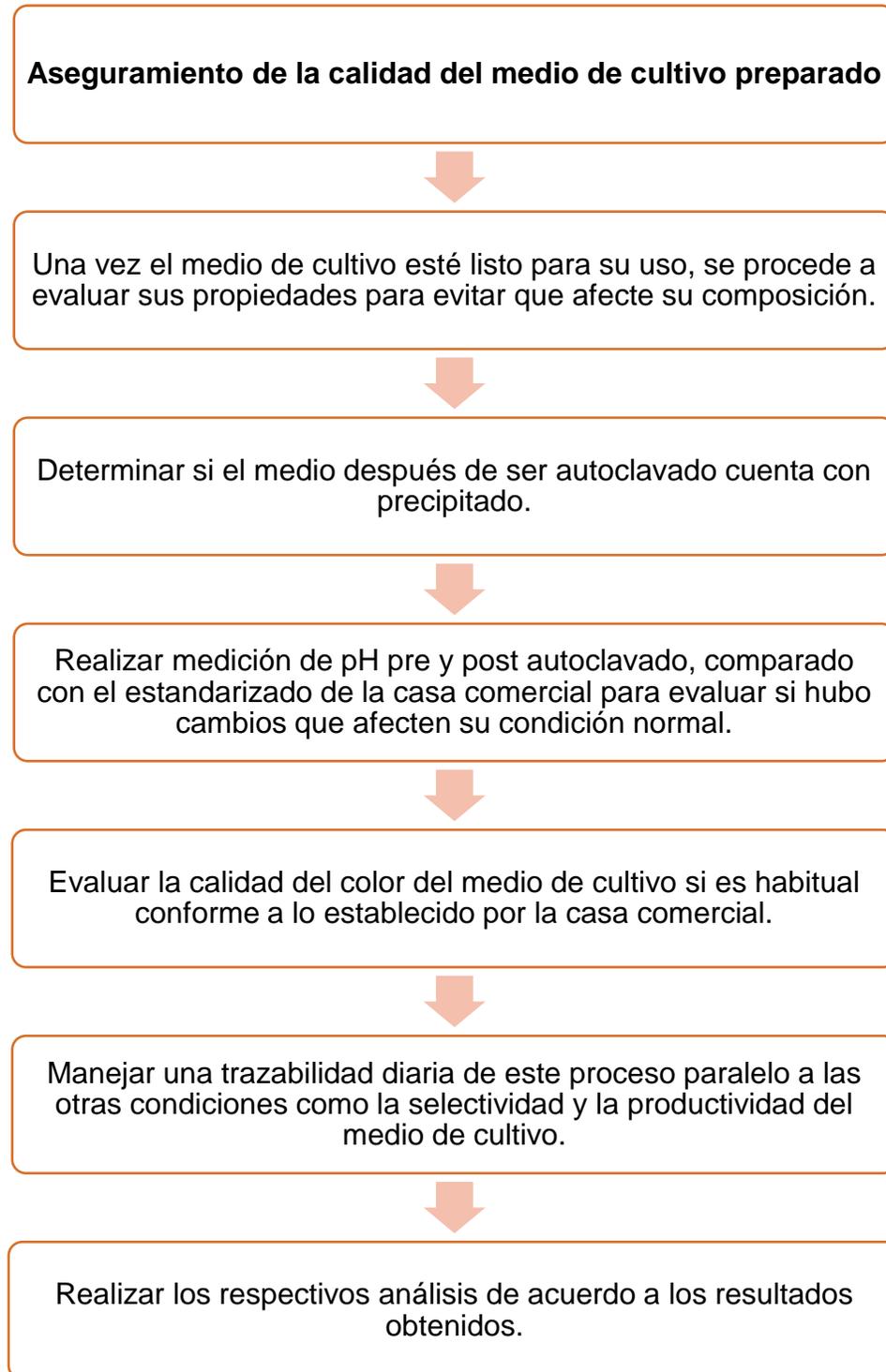
Fuente: ISO 11133:2014

4.5.7 SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO



Fuente: ISO 11133:2014

4.5.8 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL MEDIO DE CULTIVO



Fuente: ISO 11133:2014

5. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Mes	Octubre				Noviembre				Diciembre				Enero				Febrero				Marzo				Junio			
	Semana	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Inducción de la empresa y sus servicios		■	■	■																									
Manejo del área de preparación de medios		■	■	■																									
Manejo del área de pases					■																								
Manejo del área de sanidad					■	■	■	■	■	■	■	■	■																
Inducción de documentación y equipos del área de sanidad						■	■	■																					
Manejo del área de análisis especiales												■																	
Inducción de documentación del área												■																	
Manejo del área de procesos -pesaje												■	■																
Inducción de documentación del área de procesos												■	■																
Manejo del área recuentos														■															
Inducción de la documentación del área de recuentos															■														
Manejo del área de análisis de metodologías rápidas																■	■	■	■										
Inducción del área de análisis de metodología rápidas																■	■												
Revisión bibliográfica												■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Planteamiento del proyecto			■	■	■																								
Redacción del trabajo de grado					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Corrección del informe final																										■	■	■	■
Entrega del trabajo y sustentación																													■

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 RESULTADOS ESPERADOS DE LA METODOLOGÍA CONVENCIONAL O TRADICIONAL EN RECuento EN PLACA.

A continuación, se presenta un resumen de los posibles resultados que se pueden obtener al analizar diferentes muestras en el laboratorio. Es importante aclarar que los resultados obtenidos dependen de la matriz a analizar.

A modo de ejemplo, para determinar la calidad de un producto terminado como el queso fresco, el cliente comúnmente solicita análisis convencionales para determinar si su producto es apto para el consumo. Según la norma que regula y expide las características microbiológicas de este producto; la Resolución 1804 del 1989 emanada por el Ministerio de Salud, se analizan los Coliformes fecales (mediante la técnica NMP), mohos y levaduras (la técnica ISO 21527-1:2008), además de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo (técnica ISO 6888-1: 2003) y *Salmonella* spp. (NTC 4574-1).

Teniendo en cuenta que el queso es un producto que requiere gran manipulación, es necesario realizarle varias diluciones que permitan que el crecimiento obtenido sea contable, por tanto, se realizan diluciones hasta la tercera y se siembra la dilución 1, 2 y 3.

Los resultados hipotéticos se muestran en la tabla 3 y se comparan con la norma en el ítem de análisis microbiológico (Resolución 1804 del 1989 del Ministerio de Salud).

Tabla 3. Resultados de los análisis microbiológicos realizados para un queso fresco por metodologías convencionales.

Microorganismo	Recuento	Reporte	Confirmación	Informe
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁻² : 5 UFC/g 10 ⁻² : 6 UFC/g 10 ⁻³ : 0 UFC/g 10 ⁻³ : 0 UFC/g	5,5*10 ³ UFC/g	Positiva	No cumple con el criterio de buena calidad según la norma al ser >1000 UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	Reacción positiva: (3; 1; 1)	75 M.O/100g	Positiva	Cumple al ser < 100 M.O/100g
Mohos y levaduras	10 ⁻¹ :150 UFC/g 10 ⁻¹ :130 UFC/g 10 ⁻² : 15 UFC/g 10 ⁻² : 10 UFC/g	1,4*10 ³ UFC/g	No aplica	No cumple con el criterio aceptable al ser > 500UFC/g según la norma
<i>Salmonella</i> spp.	Presencia en 25 g	Presencia	Positiva	No cumple al haber presencia del microorganismo, se rechaza el producto.

Para realizar el recuento se tiene en cuenta la fórmula de recuento en placa dispuesta en la NTC-4092.

$$N = \frac{\sum C}{V(n1 + (0,1 * n2))d}$$

N: Número total de UFC por gramo o mililitro de la muestra

$\sum C$: Sumatoria del número de colonias en cada caja examinada.

V: volumen de muestra inoculada

n1: Número de cajas retenidas en la primera dilución

n2: Número de cajas retenidas de la segunda dilución.

d: Factor de dilución de la primera dilución empleada en el recuento

Recuento de mohos y levaduras

10^{-1} (150 y 130)

10^{-2} (15 y 10)

$$N = \frac{150 + 130 + 15}{1 * (2 + (0,1 * 1))0.1}$$

$$N = 1,4 * 10^3 \text{ UFC/g}$$

Recuento de *Staphylococcus aureus*.

Aplicar factor de corrección, $a = \frac{b}{A} * C$

Donde,

b: número de colonias identificadas como positivas de acuerdo a criterio microbiológico

A: número de colonias examinadas.

C: Número de colonias contadas en cada una de las cajas retenidas.

Posteriormente a esta, se deberá aplicar la fórmula del caso general.

10^{-2} (5 y 6)

10^{-3} (0 y 0)

$$a = \frac{5}{5} * 5 \quad a = \frac{5}{5} * 6$$

a: 5 y a: 6

$$N = 5,5 * 10^3 \text{ UFC/g}$$

La microbiota dominante en el queso fresco está constituida por una diversidad de bacterias ácido-lácticas (BAL), mohos y levaduras. Entre las BAL más frecuentes géneros como *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Lactococcus*, a las que se le atribuye la producción de sustancias inhibitorias de patógenos transmitidos durante el proceso de fabricación del queso fresco. Los patógenos reportados con mayor frecuencia han sido: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Brucella* spp., *Staphylococcus aureus*, entre otros (Moraes *et al.*, 2009).

Escherichia coli es un microorganismo que se encuentra comúnmente en la microbiota intestinal del hombre y de los animales, y su presencia en los alimentos indica contaminación fecal. En los EE.UU. se estima que las infecciones por queso fresco con *Escherichia coli* O157:H7 son responsables de por lo menos 20.000 casos de enfermedad y 250 muertes por año. Contrario a lo que ocurre en los EE.UU., en países como Perú, se reporta la presencia de *Escherichia coli* con prevalencias entre 2,1% y 28,1% en los quesos frescos (Delgado y Maurtua, 2003).

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla, la muestra de queso fresco no es apta para consumo humano debido a la presencia del *Salmonella* spp. como microorganismo patógeno, supera los valores permitidos de *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras a excepción de *Escherichia coli*.

Salmonella spp. es uno de los principales patógenos transmitidos por los alimentos. Se ha reportado que la prevalencia de *Salmonella* spp. en la leche y sus derivados no pasteurizados por factores como la contaminación de las manos del ordeñador, las heces de los animales, la contaminación del equipo de ordeño y las aguas contaminadas. En países como Colombia, Cuba y Ecuador se ha notificado prevalencias de *Salmonella* spp. en los quesos frescos en un 40,7%, 19% y 13,7 %, respectivamente (Castro *et al.*, 2016).

Es importante tener presente la caracterización de los microorganismos a analizar para evitar falsos positivos e incurrir en gastos innecesarios al momento de realizar la confirmación, de esta manera se tiene en cuenta el resultado esperado

tanto en tubo como en caja. Para realizar la confirmación de los microorganismos se tiene en cuenta lo establecido por la norma correspondiente para cada uno de ellos, y en dado que no establezca el proceso para su confirmación, se procede a realizar pruebas bioquímicas, en este caso mediante el equipo vitek-2 que facilita el resultado por un proceso automatizado.

Staphylococcus aureus es un microorganismo que habita frecuentemente la membrana de la mucosa nasal y la ubre de las vacas. El pH ácido, la elevada actividad del agua y la concentración de cloruro de sodio favorecen el crecimiento de este microorganismo en el queso fresco. También produce enterotoxina B estafilocócica (SEB), la cual es responsable de la intoxicación alimentaria en los humanos (Pexara *et al.*, 2012). Diversos reportes demuestran la alta prevalencia de este patógeno en países de América Latina. México determinó prevalencias de 5,76 % de *Staphylococcus aureus* en 12 muestras de queso fresco.

En Ecuador se analizaron 54 quesos (18 quesos artesanales, 18 quesos pasteurizados y 18 quesos mozzarella) en los cuales la incidencia de *Staphylococcus aureus* fue del 55%. En el 2015, Colombia notificó la presencia de *Staphylococcus aureus* en 18,2 % en los quesos doble crema artesanal. Venezuela reportó una prevalencia del 40% en el queso blanco tipo Telita y del 69,44% en el queso blanco fresco. Estudios en Brasil determinaron una prevalencia del 70,8% en el queso fresco y del 83,2% en La Habana, Cuba, en los quesos artesanales. Por último, en los EE.UU. se analizaron 33 muestras de queso fresco y en el 42% de las muestras se identificó *Staphylococcus aureus* (Díaz y González, 2001).

Las colonias de *Staphylococcus aureus* en medio Baird Parker, son negras de 1 a 5 mm con doble halo presente alrededor, de un color claro o transparente. Se confirma con la prueba de coagulasa positiva: (tomar las colonias presuntivas y enriquecerlas en Tryptic Soy Broth con un 10% de NaCl y pasado el periodo de incubación realizar la prueba tomando 1 ml del caldo en 5ml de plasma coagulase EDTA). Si se forma el coágulo se confirma la presencia de *Staphylococcus aureus* tal y como se muestra en la imagen 5.



Imagen 5. Coagulasa positivo para *Staphylococcus aureus*, (prueba de confirmación)

El medio de cultivo DRBC permite un fácil crecimiento de mohos y levaduras además de reducir el tamaño de las colonias haciendo que sea más cómodo el conteo de UFC.

Usualmente en el laboratorio se realiza la siembra en medio XLD y Hektoen; las colonias para *Salmonella* spp. en el medio de cultivo XLD, son colonias pequeñas de color negro, el medio vira de acuerdo al consumo particular del sustrato entre rosado a amarillo. En el caso del medio de cultivo Hektoen son pequeñas de color negro. Como se muestra en la imagen 6. Para el proceso de confirmación se realiza mediante ensayos bioquímicos que son realizados por el equipo vitek en el laboratorio.



Imagen 6. Crecimiento de *Salmonella* spp. en el medio de cultivo XLD/HEKTOEN

Mediante la técnica del NMP se determina la presencia de *Escherichia coli*, por la presencia de dióxido de carbono visualizado en la campana de Durham y turbidez en los tubos de caldo bilis verde brillante. Para el proceso de confirmación se realiza por pase a caldo triptófano con la producción de indol mediante el uso del reactivo Kovacs. El proceso de confirmación para la determinación de *E. coli* se realiza por pruebas bioquímicas automatizadas trabajadas en el equipo vitek-2.

Como segundo ejemplo, se realiza un ensayo para establecer la calidad de un alimento preparado como es el caso de un perro caliente. La normativa que rige esta matriz está regulada por el Invima quien establece que los alimentos preparados en los restaurantes deben ser evaluados microbiológicamente mediante análisis de aerobios mesófilos (ISO 4833-1:2013.), Coliformes totales y Coliformes fecales (técnica NMP), *Escherichia coli* (técnica NMP), *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva (ISO 6888-1: 2003), *Bacillus cereus* (ISO 7932:2005) y *Salmonella* spp. (NTC 4574-1). La tabla 4 presenta un recuento hipotético de los diferentes análisis microbiológicos que se le realizan comúnmente a un alimento como el perro caliente.

Tabla 4. Resultados hipotéticos de un análisis microbiológico de un perro caliente.

Microorganismo	Recuento	Reporte	Confirmación	Informe
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁻² : 0 UFC/g 10 ⁻² : 0 UFC/g 10 ⁻³ : 0 UFC/g 10 ⁻³ : 0 UFC/g	<10*10 UFC/g	No aplica.	Cumple con el criterio de buena calidad según la norma, al ser un valor <1000 UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	Reacción positiva: (0; 0; 0)	< 3 UFC/g	No aplica.	Cumple al ser < 3 UFC/g
Aerobios mesófilos	10 ⁻² : 250 UFC/g 10 ⁻² : 212 UFC/g 10 ⁻³ : 20 UFC/g 10 ⁻³ : 18 UFC/g	2,3*10 ⁴ UFC/g	No aplica	No cumple con el criterio aceptable al ser mayor de 10000 UFC/g
<i>Salmonella spp.</i>	Ausencia en 25 g	Ausencia	No aplica	Cumple con el criterio, al no tener crecimiento de este microorganismo
<i>Bacillus cereus</i>	10 ⁻² : 5 UFC/g 10 ⁻² : 8 UFC/g 10 ⁻³ : 0 UFC/g 10 ⁻³ : 0 UFC/g	5,7*10 ³ UFC/g	Positiva	No cumple con el criterio al ser >100 UFC/g
Coliformes totales	Reacción positiva: (3; 0; 0)	23 M.O/g	Positiva	No cumple con el criterio establecido <3 M.O/g
Coliformes fecales	Reacción positiva: (0; 0; 0)	< 3 M.O /g	No aplica	Cumple con el criterio establecido de < 3 M.O/g

Para realizar el recuento se tiene en cuenta la fórmula de recuento en placa dispuesta en la NTC-4092.

Recuento de *Staphylococcus aureus*:

$$N = < 1 * 10^2 \text{ UFC/g}$$

Recuento de *Bacillus cereus*

10⁻²: 5 y 8 ufc. $a = \frac{5}{5} * 5$ y $a = \frac{4}{5} * 8 = a: 5$ y 6,4.

10⁻³: 0 y 0 ufc.

$$N = 5,7 * 10^3 \text{ UFC/g}$$

Recuento de Aerobios mesófilos:

10⁻¹: 250 y 212 UFC/g

10⁻²: 20 y 8 UFC/g

$$N = 2,3 * 10^3 \text{ UFC/ g}$$

De acuerdo al informe emitido para cada uno de los análisis microbiológicos realizados, el alimento no es apto para el consumo humano debido a la presencia de Coliformes totales y *Bacillus cereus*, pese a cumplir con los demás criterios microbiológicos evaluados.

El consumo de vegetales crudos que comúnmente se usan para la elaboración de alimentos como el perro caliente, ha sido asociado a numerosos casos de brotes de enfermedades por microorganismos patógenos. Las estadísticas epidemiológicas indican que los tomates (*Lycopersicum esculentum*), la lechuga cruda (*Lactuca sativa*), el repollo crudo (*Brassica oleracea*) y el cilantro (*Corindrum sativus*) son los vegetales más implicados en brotes de gastroenteritis. Normalmente las hortalizas no deben ser causa de problemas de salud pública ya que son más resistentes a infecciones microbianas que los productos de origen animal. Sin embargo, es posible la transmisión de bacterias patógenas por contaminación directa con heces de animales, por el uso de estiércol como abono, aguas residuales, o por el uso de aguas de riego contaminadas. Otra fuente de contaminación es la inadecuada manipulación de los alimentos, aspecto que ha sido muy relacionado con los expendios de comida rápida. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (FAO), señala que los alimentos que se venden en la vía pública constituyen una fuente importante de alimentos nutritivos y de bajo costo, especialmente para los sectores de estratos bajos de la población urbana; sin embargo, resalta que los mismos han

demostrado ser un potencial para causar brotes de intoxicación alimentaria por contaminación microbiológica y por utilización de aditivos no permitidos (Acevedo *et al.*, 2001).

Al igual que en el anterior ejemplo, es importante tener presente la caracterización de los microorganismos a analizar para evitar falsos positivos e incurrir en gastos innecesarios al momento de realizar la confirmación. Por lo tanto, al obtener crecimiento de *Bacillus cereus* su aislamiento y confirmación se realiza mediante el uso de medios de cultivo diferenciales y selectivos como el Manitol-Yema de huevo-Polimixina (MYP). Las colonias de *Bacillus cereus* son grandes planas, irregulares y rosas (metabolismo negativo de manitol) rodeadas por un halo precipitado opaco por la acción de la lecitinasa. Estas colonias presuntivas son confirmadas por la formación de la β -hemólisis mediante una siembra en medio agar sangre de oveja como se observa en la imagen 7.



Imagen 7. Crecimiento de *Bacillus cereus* en agar sangre de oveja.

Los resultados del análisis de Coliformes fecales y de *Escherichia coli* fueron negativos, esto quiere decir que no hubo presencia de gas en las campanas de Durham ni producción de indol con el reactivo de Kovacs en el caldo lauril sulfato

triptosa después de haber sido incubados a una temperatura de 44.5°C durante 24 horas.

El crecimiento habitual de los aerobios mesófilos en el medio Plate Count varía según la morfología del microorganismo encontrando diferentes tamaños y bordes en las colonias como se observa en la imagen 8 y por lo tanto, su crecimiento no especifica los tipos de microorganismos y se omite el paso de la confirmación.

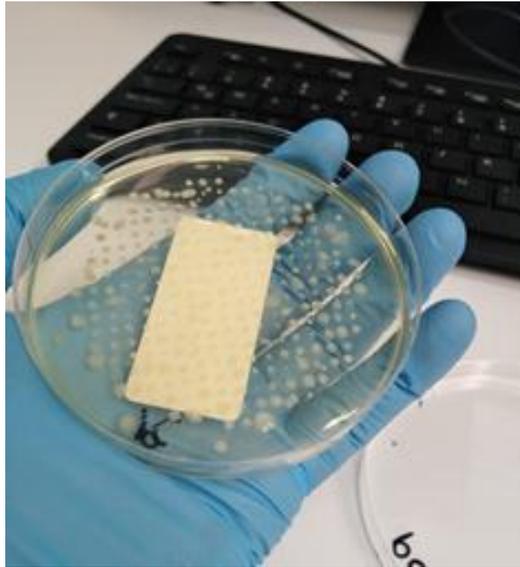


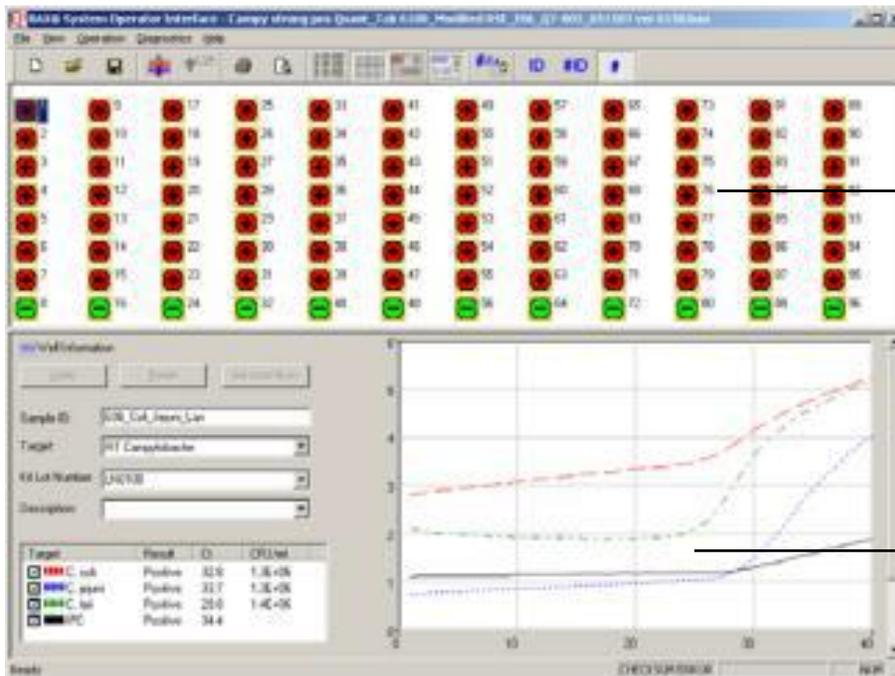
Imagen 8. Crecimiento de microorganismos en medio de cultivo Plate Count.

Un resultado positivo para la presencia de Coliformes totales se evidencia por la turbidez en los tubos con caldo lauril sulfato triptosa y la presencia de gas evidenciada en la campana de Durham. Para su confirmación, es necesario realizar el pase a unos nuevos tubos con caldo lauril sulfato triptosa con campana de Durham a una temperatura e incubar a 35°C durante 24 horas y esperar que presente de igual manera turbidez y producción de gas.

6.2 RESULTADOS ESPERADOS DE LAS METODOLOGÍAS RÁPIDAS

6.2.1 PCR- SISTEMA BAX

Una vez finalizada la corrida de la PCR bajo el sistema BAX, presentará en la pantalla del computador el documento que refleja los resultados obtenidos de cada pocillo, al igual que el área de la gráfica como se muestra en la imagen 9.



Área de resultados: los pocillos que cuenten con la muestra estarán enmarcados con diferente color de acuerdo a su resultado. Se visualiza el orden de los pocillos por el cual se ingresó.

Área de gráfica: Si se encuentra presente el microorganismo de interés; presentará curvas con los picos en la temperatura correspondiente.

Imagen 9. Modelo de la hoja de resultados expuesta en la pantalla bajo el sistema BAX.

Si se busca identificar una especie en particular o serotipo, el software mostrará mediante distintas líneas si los microorganismos que desea evaluar se encuentran presentes.

6.2.2 RESULTADOS ESPERADOS PARA LOS SEROGRUPOS DE *Escherichia coli*

A modo de ejemplo, se toma como matriz una carne de res cruda posiblemente contaminada por esta bacteria, teniendo en cuenta las indicaciones de la metodología 4.2.1

6.2.2.1 Lectura de resultados para determinación de serogrupos de *Escherichia coli*

Si el resultado obtenido es potencialmente positivo, el icono será rojo con el signo más, indicando la presencia de las dos regiones. Por tanto, las dos gráficas estarán con picos significativos en su objetivo. El reconocimiento de los serogrupos patógenos de *Escherichia coli* productores de la toxina Shiga son identificados por la base de las regiones variables del antígeno O, sin embargo, para que esto ocurra en el termociclador requiere un control positivo de estos serogrupos para verificar la amplificación cualitativa y/o cuantitativa del fragmento de ADN.

A causa de la naturaleza patógena de las STEC, los controles no están fácilmente disponibles y el cultivo celular de cepas de referencia de STEC requiere condiciones de bioseguridad de nivel 2 o superiores (Conrad *et al.*, 2012). Con el fin de eludir esta limitación, se diseñaron controles de fragmentos de ADN específicos de tipo O apilados que codifican sitios de reconocimiento de cebadores para detectar nueve serogrupos de los cuáles en el laboratorio se reconocen 6 de STEC (*E. coli* O26, O111, O121; O45, O103, O145) frecuentemente asociados con la infección humana. Para la validación de los controles recomendados por la casa comercial, debieron pasar por una amplificación PCR, posterior a una clonación en un vector plasmídico y se transfirieron a células hospedadoras de bacterias. Los plásmidos amplificados por expresión bacteriana se purificaron, se diluyeron en serie y se probaron como estándares para PCR en tiempo real utilizando ensayos SYBR Green y TaqMan (Conrad *et al.*, 2012). La utilidad de los controles de ADN sintético se demostró en

ensayos de PCR convencionales y en tiempo real y se validó con ADN de cepas STEC naturales. De esta manera, el proceso de reconocimiento de los serogrupos se convierte en un trabajo más sencillo una vez fueron validados para su uso y entrada a la venta en el mercado.

El sistema Bax, permite reconocer 6 serogrupos los cuales se encuentran ubicados en dos grupos, panel 1 (*E. coli* O26, O111, O121) y panel 2 (O45, O103, O145); las ventajas de estos, es que al usarlos en la reacción de cadena polimerasa (PCR) permite el empleo de detección de genes que codifican antígenos O específicos de cepas; tienen la ventaja de ser menos costosos, altamente sensibles además de permitir que haya mayor alcance en los laboratorios para realizar tales análisis frente a los métodos serológicos los cuales son más costosos; requieren reactivos especializados y un mayor tiempo de respuesta.

La vía de transmisión más importante para STEC es a través del consumo de carne de res molida cruda o poco cocida contaminada. *E. coli* O157:H7 se ha identificado como una de las cepas de STEC responsable de enfermedades y morbilidad graves transmitidas por los alimentos en todo el mundo. Teniendo en cuenta que la muestra a evaluar fue carne de res cruda es necesario recordar que los bovinos se consideran reservorios primarios de STEC y, en general, no presentan síntomas causados por estas bacterias. Sin embargo, los equipos, en particular cuchillos, sierras y mesas utilizados en la línea de producción de canales de vacuno pueden convertirse en un medio de propagación de STEC a otras canales y cortes de carne. Debido a la alta demanda de carne de vacuno en todo el mundo y la falta de prácticas higiénicas adecuadas, varios estudios han demostrado un aumento de las epidemias de STEC relacionadas con enfermedades humanas en todo el mundo (Hernández *et al.*, 2009).

E. coli O157 y *Salmonella* spp., siguen siendo las preocupaciones de seguridad alimentaria más importantes asociadas con el consumo de carne de res. El ganado es portador común de estos microorganismos en sus heces,

transfiriéndolos a pieles y canales durante las operaciones de sacrificio (Elder *et al.*, 2000).

En Colombia, los planes de prueba de los mataderos y la vigilancia gubernamental tienden a centrar sus esfuerzos principalmente en *E. coli* O157:H7, mientras que se realiza una frecuencia de prueba más baja para *Salmonella* spp. Esto quizás se base en la suposición de que existe una menor prevalencia de estos grupos patógenos en su ganado de carne. Una de las principales contribuciones del estudio de Calle *et al.*, 2021 fue informar que los "seis grandes" STEC no O157 tenían la mayor prevalencia en muestras fecales (51,0%), en comparación con *E. coli* O157: H7 (5,0%) y *Salmonella* spp. (8,3%). El serogrupo de STEC más prevalente fue O45 (57,2%, 99/173), seguido de O121 (40,5%, 70/173), O103 (31,2%, 54/173), O26 (20,2%, 35/173), O145 (15,0%, 26/173) y O111 (4,0%, 7/173). El 84,7% de las muestras fecales analizadas portaban al menos uno de los genes virulentos asociados a las infecciones por STEC (stx o eae). Este hallazgo sugiere que en Colombia las pruebas para STEC no O157 deberían ser una prioridad (Calle *et al.*, 2021).

6.2.3 RESULTADOS ESPERADOS PARA *E. coli* O157:H7

Sí es positivo, en el gráfico aparecerá un pico en el rango de 81- a 90°C objetivo y el otro en el rango de 79 a 82°C del INPC, por tanto, el pocillo aparecerá rojo con signo más. Sí es negativo no aparecen los dos picos en la gráfica objetivo, sin embargo, el control interno positivo arroja positivo, y como consecuencia el pocillo aparecerá de color verde con un signo negativo. La confirmación de este serotipo se evalúa con una tarjeta serológica añadiendo 200 µL de la muestra poniendo en agitación durante 5 minutos. Si el resultado es positivo dará una coloración azul.

Examples of Typical Melt Curves for Positive *E. coli* O157:H7 Samples

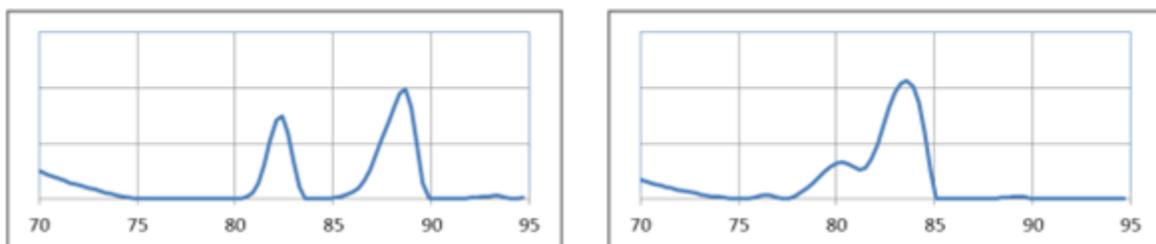


Imagen 10. Ejemplos típicos de curvas que representan la presencia del microorganismo *E. coli* O157:H7

En la primera gráfica se encuentra el ejemplo más común por la presencia de los dos picos objetivos (pico de control) y el pico del gen que determina la presencia de *Escherichia coli*. La segunda imagen difiere de la primera al poseer un pico menos pronunciado en el INPC, esto se debe a la concentración del microorganismo presente en la muestra, por lo tanto, sólo se verá fuerte el segundo pico.

El establecimiento de nuevas metodologías para la detección de *E. coli* O157:H7 en alimentos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha permitido el mejoramiento en el diagnóstico y determinación de riesgos de salud pública asociados con su consumo. Así, los métodos moleculares en Microbiología de alimentos ofrecen una alternativa eficiente en comparación con los métodos estándares para la identificación de patógenos de interés en salud pública (Venkateswaran *et al.*, 1997).

Escherichia coli O157: H7 es un patógeno zoonótico bacteriano emergente, que causa morbilidad y mortalidad significativas en países en desarrollo y desarrollados del mundo. Las cepas específicas de *E. coli* que son patógenos para los seres humanos, incluyen enterotoxigénica, enteropatógena (EPEC), difusamente adherente (DAEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva y verotoxigénica (VTEC también se conocen como *E. coli* shigatoxigénica, STEC o enterohemorrágica). Recientemente, la verotoxina que expresa EAEC se ha identificado como un problema de salud pública importante. Causan una amplia gama de enfermedades, desde diarrea leve hasta colitis hemorrágica con dolor abdominal intenso y diarrea sanguinolenta. La enfermedad suele ser autolimitada y se resuelve después de unos ocho días. *Escherichia coli* O157: H7 es responsable del 20% de los brotes transmitidos por alimentos. Se ha identificado a los rumiantes como el principal reservorio de *E. coli* O157: H7, y el ganado bovino es la fuente más importante de infecciones humanas. Además, otros rumiantes como ovejas, cabras y ciervos también albergan estas bacterias. Se cree que las aves son probablemente huéspedes de transporte de *E. coli* O157: H7. Además,

las moscas y los escarabajos, incluidas las moscas domésticas y las moscas de la suciedad de varias especies, y los escarabajos peloteros también pueden actuar como posibles huéspedes de transporte. Varias rutas de infección humana por *E. coli* O157: H7 son el contacto directo, la propagación de persona a persona, los alimentos contaminados y el agua contaminada. Varios alimentos como la carne, la leche, el queso, los jugos, las ensaladas, las verduras, frutas, etc., pueden servir como vehículo para *E. coli* O157: H7 (Pal y Ayele, 2019).

6.2.4 RESULTADOS ESPERADOS PARA *Listeria monocytogenes*.

Listeria monocytogenes es un microorganismo encontrado ampliamente en el medio ambiente, en el suelo, la vegetación en descomposición y el agua y puede ser parte de la flora fecal de muchos mamíferos, incluidos los adultos humanos sanos. *L. monocytogenes* presenta una preocupación particular con respecto a la manipulación de alimentos porque puede crecer a la temperatura del refrigerador (4 °C a 10 °C), temperaturas comúnmente utilizadas para controlar los patógenos en los alimentos. La congelación también tiene poco efecto perjudicial sobre él. Aunque la pasteurización es suficiente para destruir *Listeria*, si no se alcanza la temperatura deseada, el microorganismo puede sobrevivir. Los alimentos también pueden contaminarse después de su procesamiento por la introducción de material no pasteurizado, como ocurre durante la preparación de algunos quesos. *Listeria* también se puede transmitir por contacto con manos, equipos y mostradores contaminados (Bortolussi, 2008).

La imagen 11 muestra el resultado hipotético de una muestra para *Listeria monocytogenes*. El resultado se considera positivo cuando se observa un pico objetivo a aproximadamente a 85°C, rango de pico objetivo de 83 a 88°C y rango de pico de control entre 76 - 81°C. Para que esto se presente debe estar presente el gen 24.e

Un resultado se considera negativo cuando no hay pico objetivo; gran pico de control presente.

Examples of Typical Melt Curves for Positive *L. monocytogenes* Samples

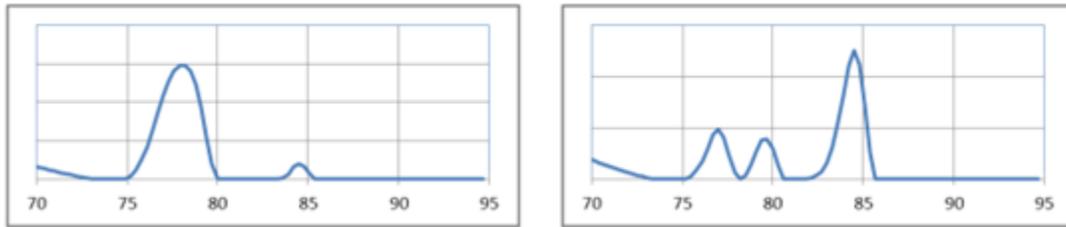


Imagen 11. Ejemplo de gráfica correspondiente a una muestra positiva para *Listeria monocytogenes*.

Como se observa en la imagen 11, el pico control puede formarse entre el rango de 76-81°C bien sea con uno o doble pico como se evidencia en la gráfica del lado derecho.

Los productos alimenticios comúnmente asociados con la listeriosis están listos para el consumo, debido a las propiedades inherentes de ser ricos en proteínas, tener una actividad de agua moderada y una microflora de fondo baja (Warriner y Namvar, 2009).

Los datos indican que la presencia de *L. monocytogenes* en productos alimenticios listos para el consumo varía según las categorías de productos; desde el 0,09% para los quesos duros elaborados con leche pasteurizada al 3% para la carne bovina. La capacidad de *L. monocytogenes* para sobrevivir a diversas tecnologías de procesamiento influye en su capacidad para colonizar y persistir en el equipo de procesamiento de alimentos (FPE), lo que lo convierte en un patógeno importante transmitido por los alimentos. La supervivencia en todo el FPE puede provocar la contaminación cruzada de productos como los alimentos listos para el consumo que se consideran productos de alto riesgo debido a la falta de cocción adicional antes del consumo, y vehículos comunes para los brotes de listeriosis (Evans *et al.*, 2021).

6.2.5 RESULTADOS ESPERADOS PARA *Campylobacter* spp.

Campylobacter es una de las principales causas de gastroenteritis bacteriana en el mundo, lo que atrae la atención mundial para la vigilancia y el control. Dentro de los reservorios más comunes en los que se encuentra este microorganismo, están las aves, el ganado vacuno y ovino. Como ejemplo, se puede encontrar que las aves contaminadas al ingresar a la cadena del procesamiento pueden realizar contaminación cruzada con otras aves, superficies en contacto con alimentos y equipos de procesamiento. Como resultado, *Campylobacter* también se puede identificar en fuentes ambientales que incluyen heces, fuentes de agua, equipos y maquinaria utilizados en la cadena de producción de alimentos. Aunque generalmente se considera incapaz de replicarse fuera de los hospedadores animales debido al estricto requisito de crecimiento para la condición microaeróbica y al estrecho rango de temperatura de crecimiento (30-42 °C), *Campylobacter* puede sobrevivir y persistir a través de múltiples mecanismos de respuesta al estrés en el entorno de la cadena alimentaria. En el caso de *C. jejuni*, una estrategia de supervivencia es la formación de biopelículas, donde se desarrolla una capa de sustancias poliméricas extracelulares después de que la comunidad microbiana se adhiere a superficies no biológicas, proporcionando resistencia a ambientes desfavorables (Tong *et al.*, 2021).

Se estima que causa entre 400 y 500 millones de casos de diarrea cada año en todo el mundo. Los síntomas de infecciones por *Campylobacter* incluyen diarrea acuosa o con sangre, fiebre, pérdida de peso, vómitos y calambres. Además, se ha descubierto que está correlacionado con otras complicaciones gastrointestinales de aparición tardía que incluyen enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y cáncer colorrectal; y complicaciones no gastrointestinales como el síndrome de Guillain-Barré (GBS). Por esta razón, se hace necesario que sea analizada al igual que otros microorganismos causantes de ETAS (Tong *et al.*, 2021).

La imagen 12 muestra el resultado hipotético para un análisis mediante metodologías rápidas para *Campylobacter*.

Target	Result	Ct	CFU/ml
<input checked="" type="checkbox"/>  C. coli	Positive	32.8	1.3E+06
<input checked="" type="checkbox"/>  C. jejuni	Positive	33.7	1.3E+06
<input checked="" type="checkbox"/>  C. lari	Positive	29.8	1.4E+06
<input checked="" type="checkbox"/>  IPC	Positive	34.4	

Imagen 12. Ejemplo de resultados cuantitativos de *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* y el IPC

Se considera un resultado positivo si el resultado del pocillo arrojado en el programa está en color rojo con un signo “positivo”, lo cual indicará la presencia de una de las tres especies de *Campylobacter* spp. que analiza el software en comparación con la muestra puesta en marcha en el termociclador.

Para conocer los resultados cuantitativos sobre los tres tipos de *Campylobacter* analizados se visualiza la parte inferior del recuadro.

Para cada objetivo diferenciado, se reportan resultados positivos/negativos, junto con el ciclo en el cual la señal fluorescente alcanza el umbral de detección (Ct). Se requiere siempre un resultado positivo en el control interno positivo (IPC) para evitar errores en los resultados.

En caso de requerir confirmación, se realiza una siembra de este microorganismo en medio SPS y se incuba en condiciones microaeróbicas a 42°C +/-2°C durante 44 horas. También se debe realizar tinción y prueba de catalasa.

Además de la estimación de la prevalencia de *Campylobacter*, muchos programas de vigilancia hacen un esfuerzo por separar los patógenos aislados en grupos mediante métodos moleculares, también llamados tipificación molecular. El primero tiene como objetivo cuantificar la prevalencia y la carga bacteriana de *Campylobacter* descubierta en cada ubicación de la cadena alimentaria, mientras

que el segundo tiene como objetivo rastrear los patógenos hasta sus fuentes. La tipificación molecular permite establecer asociaciones entre diferentes aislamientos. Estas asociaciones se utilizan para vincular casos humanos entre sí y con la fuente del brote (Tong *et al.*, 2021).

6.2.6 RESULTADOS ESPERADOS PARA *Salmonella* spp.

Si el microorganismo está presente, en la gráfica se presentan tres picos uno en la de 85°C, 88°C y 90°C. El rango del pico de control se encuentra en el rango de 76°C a 80°C.

Cuando el microorganismo no se encuentra en la muestra no hay pronunciamiento de picos de interés, sólo se aprecia el control.

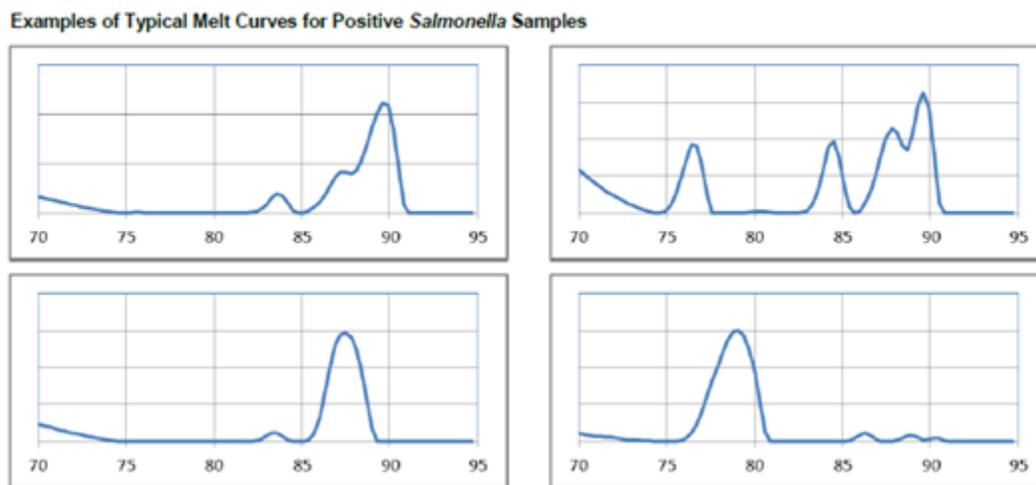


Imagen 13. Ejemplo de gráficas que representan la presencia de *Salmonella* spp. en una muestra

Las muestras que son positivas para *Salmonella* spp., mostrarán tres picos objetivo, estos suelen aparecer entre 82 y 91°C, con una distancia de aproximadamente 5°C entre el primer y el tercer pico objetivo. Si una muestra marca un resultado positivo fuerte, los picos objetivo pueden fusionarse de modo que solo se verán dos picos distintos.

El gráfico también muestra un INPC, o pico de control, que suele aparecer entre 76 y 80°C. Si una muestra un resultado positivo fuerte, el INPC puede ser muy pequeño en comparación con los picos objetivo.

La información sobre brotes de origen alimentario es escasa y difícil de encontrar para países de América del Sur. Como indican Galli *et al.* (2016), la mayoría de estos países no realizan estudios de casos y controles para investigar los brotes y no pueden definir la magnitud y la propagación de tales enfermedades enfocadas a los microorganismos más patógenos encontrados en los alimentos.

Debido a lo anterior, se realizó el primer estudio en Colombia enfocado a la prevalencia de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y STEC no O157 en la cadena de producción de carne de res. Se tuvo en cuenta variables como el efecto estacional, el tipo de muestra, el sexo y la edad de los animales en relación con la prevalencia de patógenos. El muestreo fue integral, incluidos los cinco mataderos más grandes del país, que no solo sacrifican alrededor del 50% del ganado vacuno en el país, sino que también reciben animales de todas las principales zonas productoras de Colombia, concluyendo que las matrices que contenían mayor carga de estos microorganismos fueron: la proporción de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7 en pieles y canales tuvo una tendencia a ser mayor durante los meses secos en comparación con la temporada de lluvias. A través de estos estudios, se puede evidenciar la importancia de analizar estos microorganismos patógenos, ya que independientemente del clima, estos pueden encontrarse con mayor prevalencia en las carnes bovinas. Los animales presentados para el sacrificio que porten patógenos en su piel, se convertirán en una fuente de contaminación dentro de las instalaciones durante el faenado de las canales. Estos resultados sugieren que los mataderos deben prestar especial atención a las prácticas de faenado de cadáveres y a la prevención de la contaminación cruzada de pieles a superficies de contacto con alimentos, trabajadores u otros cadáveres (Calle *et al.*, 2021).

6.3 RESULTADOS ESPERADOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS POTABLES Y ENVASADAS POR EL MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Los análisis realizados en el laboratorio para muestras tomadas de diferentes áreas o puntos de recolecta de aguas potable y de piscinas se realizan mediante la técnica de filtración por membrana. A continuación, se evidencia los resultados comúnmente obtenidos dentro de la empresa a manera de ejemplo, y se evidencian algunos resultados particulares que se pueden presentar en algunas muestras.

Para el agua potable, se determina que las características microbiológicas deben enmarcarse dentro de los valores máximos aceptables establecidos en la Resolución 2115 de 2007. Donde; el crecimiento de Coliformes totales y *Escherichia coli* debe ser de 0 UFC/100cm³ y para aerobios mesófilos deberá ser ≤100 UFC/100cm³. En caso de no cumplir con lo establecido en la norma para las características microbiológicas, se rechaza el agua potable analizada y se informa al cliente que el agua no es apta para consumo humano.

Según la Resolución 1618 del 2010 del MPS, establece que las características microbiológicas a analizar de aguas de piscina de uso recreativo públicas o privadas deberán ser: Coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* de 0 UFC/100 cm³ aerobios mesófilos <200 UFC/100 cm³ y ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* en 100 cm³. Exceptuando los análisis de *Giardia* y *Cryptosporidium parvum*, la empresa realiza los análisis microbiológicos anteriormente mencionados determinando si dentro del ítem microbiológico cumple con los parámetros para evaluar la calidad del riesgo de la piscina.

A continuación, se presentan imágenes de los modelos trabajados en la empresa con algunos crecimientos o sin estos, de diferentes muestras analizadas. En la imagen 14 se ejemplifica un resultado con presencia de Coliformes totales y Coliformes fecales en una muestra de piscina pasadas las 24 horas de incubación en un filtro enriquecido con el caldo Endo. Se cuentan las colonias verdes brillantes aplanadas que son características de *Escherichia coli* y se realiza la

confirmación mediante el aislamiento de ésta para ser confirmada mediante pruebas bioquímicas automatizadas.

En la imagen 15 se observa un posible resultado de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en agua de piscina, para su confirmación, se somete a pruebas bioquímicas automatizadas. Cabe aclarar que, si alguno de los criterios microbiológicos analizados para el agua de piscina no cumple con los parámetros, esta deberá ser informada a la empresa prestadora del servicio y paralelamente deberá ser analizada en conjunto con el área del laboratorio fisicoquímico de la empresa ALS, para determinar cuál es el índice de riesgo que presenta esta agua.

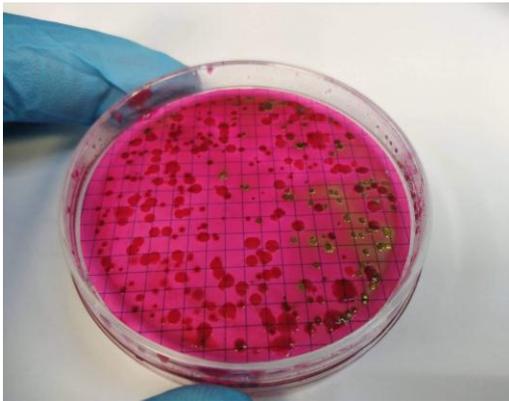


Imagen 14. Resultado con crecimiento de coliformes Totales; método filtración por membrana

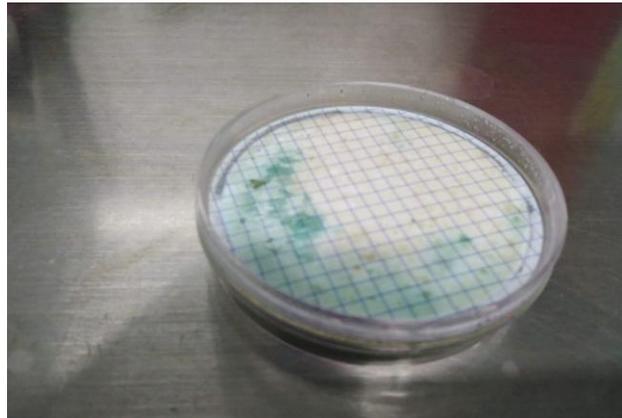


Imagen 15. Resultado con crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*

Desde el punto de vista de la salud pública, el análisis microbiológico de aguas de piscina es de gran importancia ya que conduce al aislamiento e identificación de microorganismos de contaminación fecal que pueden provocar enfermedades como otitis, gastroenteritis, infecciones genitourinarias, conjuntivitis, entre otras. Esta situación acelera el proceso de degradación del índice de calidad del agua (ICA) de las piscinas, representando un riesgo sanitario para sus usuarios (Colmenares *et al.*, 2008).

Las bacterias patógenas en el agua pueden controlarse eficazmente mediante la cloración; el tratamiento de aguas de uso recreacional requiere una interpretación rigurosa de estudios de laboratorio dirigidos por expertos para una desinfección confiable y eficaz. De acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud (OPS), todos los países de América y del Caribe deben incorporar el concepto de barreras de protección para combatir la transmisión de microorganismos patógenos durante los procesos de captación, tratamiento, almacenamiento y distribución de agua para suministro (OPS, 2000).

6.4 RESULTADOS ESPERADOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS DE RIEGO MEDIANTE EL MÉTODO DE NMP.

Mediante la técnica del NMP se analiza el agua de riego comúnmente usado por los agricultores, en este caso la norma que limita y regula estos procesos están enmarcados en el Decreto 1594 del año 1984 expuesto por el Ministerio de Agricultura. Considerando los siguientes criterios, se acepta el uso del agua de riego para frutas en buena calidad cuando esta tiene un valor máximo de coliformes totales de 5000 microorganismos/100 ml y de fecales de 1000 microorganismos/100 ml.

A modo de ejemplo, se recepciona un agua de riego para frutas y se realiza la metodología convencional del NMP por 5 tubos obteniendo los resultados mostrados en la tabla 5 para Coliformes totales y fecales.

Tabla 5. Resultados hipotéticos de un análisis microbiológico en una muestra de agua de riego.

Lauril sulfato de triptosa	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	Reporte
Coliformes totales	5	4	4	350 microorganismos/100 ml
Coliformes fecales	5	1	1	46 microorganismos/100 ml

Para determinar que había presencia de coliformes totales fue necesario visualizar la presencia de gas en la campana de Durham y turbidez en el caldo incubado a 35°C durante 24 horas. La confirmación de los tubos presuntivos se realiza en el caldo lauril sulfato de triptosa y se incuban a 35°C durante 24 horas y a 44.5° C por 24 horas (para coliformes fecales). La presencia de gas en las campanas Durham en los tubos incubados a 35°C y 44.5°C y la formación del halo rojo producto de la reacción al agregarle el reactivo de Kovacs (ver imagen 16) a este último, determina la presencia de coliformes totales y fecales de los tubos, respectivamente.

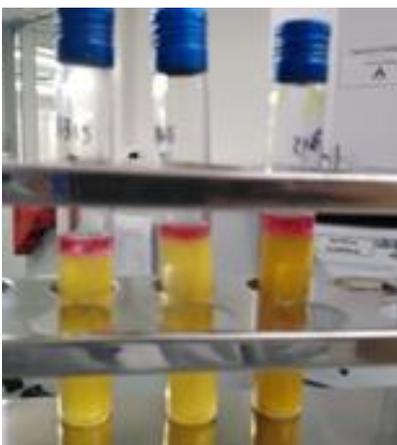


Imagen 16. Análisis mediante la técnica NMP para Coliformes fecales en lauril sulfato de triptona. Resultado positivo para agua de riego.

El agua destinada a la producción agrícola puede ser no solamente una fuente de contaminación sino también puede ayudar a la diseminación de los microorganismos en el producto que está en proceso de cosecha o producción, por lo cual, cada vez que esta entra en contacto con el producto existe una gran posibilidad de contaminación ya sea en la cosecha o postcosecha del producto.

6.5 RESULTADOS ESPERADOS PARA ESTERILIDAD COMERCIAL Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS.

6.5.1 RESULTADOS ESPERADOS PARA ESTERILIDAD COMERCIAL

Se considera que el producto está estéril y es satisfactorio cuando en los 8 tubos de anaerobiosis y los 8 tubos de aerobiosis no se observa crecimiento, en caso contrario, se reporta prueba de esterilidad no satisfactoria.

A modo de ejemplo, se evalúa la esterilidad comercial de la leche entera de un determinado lote. Los resultados se muestran en las tablas 6 y 7. Se tienen en cuenta las características organolépticas y el crecimiento microbiano.

Tabla 6. Resultados hipotéticos del análisis organoléptico de una muestra de leche entera.

Análisis	Inicial	Pasado los 7 días- a 35°C	Pasados los 7 días a 55°C	Informe final
Color	Característico	Característico	Caramelizado característico	Cumple
Olor	Característico	Característico	Levemente dulce característico	Cumple
Aspecto	Característico	Característico	Formación de nata	Cumple
pH	Característico	Característico	6,6	Cumple con el rango establecido entre 6,5 a 6,85.

Las propiedades organolépticas juegan un papel importante a la hora de evaluar la esterilidad de la leche, ya que esta permite evidenciar los primeros cambios que indican problemas físico químicos o microbiológicos en el producto.

En este caso los resultados fueron normales y satisfactorios ya que a razón de la composición de la leche a altas temperaturas puede evidenciar cambios físicos como se muestra en la temperatura de 55°C por la formación de nata y tornar un color caramelizado.

En cuanto al análisis microbiológico, en dado caso que se presente crecimiento en los tubos de 35°C en aerobiosis evaluar si este no fue por contaminación ambiental confirmando con los controles ambientales realizados durante el proceso. En este caso se presentan los siguientes resultados:

Tabla 7. Resultados del crecimiento obtenido para evaluar la esterilidad comercial del producto de una leche entera UHT.

Producto Leche entera UHT	Resultado de los tubos de aerobiosis incubados a 35°C	Resultado de los tubos de anaerobiosis incubados a 35°C	Resultado de los tubos de aerobiosis incubados a 55°C	Resultado de los tubos de anaerobiosis incubados a 55°C
Pase a caja en medio TSA	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento

En dado caso que se presente algún crecimiento en caja de alguno de los resultados en tubo, se procede a realizar tinción de Gram y reportar al cliente de lo ocurrido una vez que se haya comprobado que no fue producto de contaminación.

Si el cliente lo solicita, se pasa a realizar identificación del microorganismo mediante siembra en medios selectivos y pruebas bioquímicas en el equipo automatizado de vitek.

6.5.2 RESULTADOS ESPERADOS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS

Los cosméticos son todos aquellos productos que tienen como función cuidar la higiene personal y mantener su cuidado bien sea perfumándolas, cambiando su apariencia o manteniéndolas en buen estado. El control de calidad microbiológico de las materias primas y productos cosméticos terminados es fundamental para garantizar la seguridad del consumidor y cumplir con los requerimientos de la reglamentación legal vigente.

Los cosméticos de color como sombras de ojos y lápices labiales, productos para el cabello como aerosoles y champús, y productos para el cuidado de la piel como

jabones y cremas, todos pertenecen al grupo llamado “cosméticos”. Los cosméticos se definen como “cualquier artículo destinado a ser frotado, vertido, rociado o rociado, introducido o aplicado de otra manera al cuerpo humano o cualquier parte del mismo para limpiar, embellecer o promover el atractivo, o alterar la apariencia, e incluye cualquier artículo destinado a ser utilizado como componente de “cosméticos”(Oyencule *et al.*, 2021).

Para ejemplificar el resultado de un ensayo comúnmente analizado en el laboratorio se tuvo en cuenta el jabón de manos. Los jabones convencionales son tensioactivos a base de productos naturales y representan una parte de los productos de limpieza necesarios para los procesos domésticos, o de nuestra piel, usualmente nuestras manos. Son necesarios para la eliminación de gérmenes, contaminantes y suciedad. Los jabones se producen a partir de la saponificación de aceite con álcali. Los aceites comúnmente utilizados en Nigeria incluyen aceite de coco, manteca de cerdo, aceite marino, aceite de semilla de palma, etc. (Oyencule *et al.*, 2021).

Normalmente en la elaboración de productos cosméticos se debe tener precaución con los siguientes puntos que generan la mayor contaminación en los casos; la materia prima, el medio ambiente, equipos utilizados durante la elaboración y el envasado, material del empaque primario y el personal que manipula el producto.

En diversos estudios se han aislado *Salmonella* spp., *S. aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Escherichia coli* y *P. aeruginosa* a partir de máscaras, delineadores de ojos y polvos faciales, al tiempo que identificaron el vínculo entre *S. aureus* y afecciones como la conjuntivitis y el impétigo. Se han identificado brillos de labios y lápices labiales como vectores de especies patógenas como *Escherichia hermannii*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* y *Enterobacter*. En una investigación realizada en Estados Unidos, se determinó el contenido microbiano de diferentes cosméticos encontrando que aproximadamente el 79-90% de todos los productos usados estaban contaminados con bacterias, con cargas bacterianas que oscilaban entre 10^2 y 10^3 UFC/ml. Se detectó presencia de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Citrobacter freundii*. Se detectaron enterobacterias y

hongos en todos los tipos de productos y prevalecieron en los mezcladores de belleza (Bashir *et al.*, 2020).

La tabla 8 presenta los resultados hipotéticos del ensayo realizado a una muestra de jabón de manos. Para realizar el recuento de aerobios mesófilos en siembra por profundidad, se realizan diluciones hasta la 10^{-2} . Los demás microorganismos se realizan por estría una vez se haya incubado la muestra en el caldo como fue descrito en el procedimiento

Tabla 8. Resultados hipotéticos del análisis microbiológico de una muestra de jabón.

Microorganismo	Recuento	Reporte	Informe
Aerobios mesófilos	10^{-1} : 120 10^{-1} : 100 10^{-2} : 32 10^{-2} : 40	$1,3 \times 10^3$ UFC/ml	Cumple según lo dispuesto en la resolución 2120 del 2019 al ser menor de 5×10^3 UFC/ml. Se acepta el producto.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sin crecimiento	Ausencia en 1 ml	Cumple con lo dispuesto en la Resolución 2120 del 2019 respecto a la ausencia del microorganismo. Se acepta el producto.
<i>Escherichia coli</i>	Sin crecimiento	Ausencia en 1 ml	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sin crecimiento	Ausencia en 1 ml	

Para realizar el recuento se tiene en cuenta la fórmula de recuento en placa dispuesta de igual manera en la NTC 4092.

$$N = \frac{\sum C}{V(n1 + (0,1 * n2))d}$$

N: Número total de UFC por gramo o mililitro de la muestra

$\sum C$: Sumatoria del número de colonias en cada caja examinada.

V: volumen de muestra inoculada

n1: Número de cajas retenidas en la primera dilución

n2: Número de cajas retenidas de la segunda dilución.

d: Factor de dilución de la primera dilución empleada en el recuento

Recuento de aerobios mesófilos

10^{-1} (120 y 100)

10^{-2} (32 y 40)

$N = 1,3 * 10^3$ UFC/ml

De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 8, el jabón analizado se encuentra en óptimas condiciones microbiológicas cumpliendo con lo dispuesto en la resolución 2120 del 2019 la cual establece que para productos cosméticos susceptibles de contaminación microbiológica, el recuento de microorganismos mesófilos aerobios totales debe ser de máximo 5×10^3 UFC/g o ml y ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en 1 g o ml.

El análisis de aerobios mesófilos permite estimar la microbiota del producto en cuestión, pero sin especificar e identificar el tipo de microorganismo. Es por esta razón que incluye a todos los microorganismos capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno a una temperatura comprendida entre 20 °C y 45 °C. Por tanto, un crecimiento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o de sus toxinas, de la misma manera que un recuento elevado no implica presencia de microorganismos patógenos. Es importante tener en cuenta que las condiciones elevadas de crecimiento de mesófilos pueden significar excesiva contaminación de la materia prima, la inmediata alteración del producto, deficiente manipulación durante el proceso de elaboración y además la posibilidad de que existan patógenos (COLIPA, 1997).

6.5.2.1 VERIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Para determinar si hay crecimiento *Staphylococcus aureus* es necesario identificar las colonias en Baird Parker negras, brillantes, rodeadas de zonas claras o halos de un tamaño de 2mm a 5mm y tinción para cocos Gram positivos en racimos. Para confirmar se debe realizar la prueba de coagulasa, catalasa y batería de bioquímicas disponible comercialmente en dado caso que el cliente lo solicite.

Si es el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, verificar el crecimiento de colonias verdes en agar Cetrimide, con presencia de fluorescencia bajo luz UV y tinción para bacilos Gram negativos. Para confirmar se debe realizar la prueba de oxidasa y batería de bioquímicas disponible comercialmente y por último para verificar la presencia de *Escherichia coli* las colonias deben ser de color rojo con zona de precipitación de bilis alrededor, en agar MacConkey y tinción para bacilos Gram negativos. Para confirmar se debe realizar prueba de indol a 44°C +/- 0.5 °C y batería de bioquímicas disponible comercialmente

Para cosméticos y otros productos tópicos, la detección de patógenos de la piel como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* pueden ser relevantes porque pueden causar o infecciones oculares. La detección de otros tipos de microorganismos puede ser de interés ya que estos microorganismos (incluidos los indicadores de contaminación fecal, por ejemplo, *Escherichia coli*) sugieren falla en la higiene durante el proceso de fabricación.

En casos particulares se han reportado presencia de patógenos oportunistas en cosméticos como fue presentado en un hospital de tercer nivel en Europa, el hecho fue tan alarmante que decidieron evaluar los procesos y determinar si hubo contaminación cruzada con los jabones ya en uso o fue proveniente directamente de la fábrica. Dentro del análisis se encontraron envases de jabón sin abrir contaminados con *P. aeruginosa* demostró que la contaminación ocurrió durante la fabricación del producto. Según la regulación Suiza, no se requiere ningún estándar de calidad bacteriológica para los cosméticos, a menos que se use en bebés o alrededor de los ojos, lo que no es el caso del jabón de manos. Aunque el jabón contaminado no tuvo ningún impacto en los pacientes, estos reservorios

adicionales de *Pseudomonas* no deben tolerarse en los hospitales donde hay pacientes de alto riesgo (Gomes *et al.*, 2016).

6.6 ESTANDARIZACIÓN DE LOS INÓCULOS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA MOHOS Y LEVADURAS.

Siguiendo los pasos de la metodología, se realizó la estandarización del inóculo teniendo en cuenta como primera medida los cuidados en las buenas prácticas de laboratorio.

Durante todo el proceso, el trabajo se realizó en la cabina de bioseguridad; esto con el fin de disminuir considerablemente la contaminación que se podría presentar en el aire, afectando el proceso de preparación del inóculo.

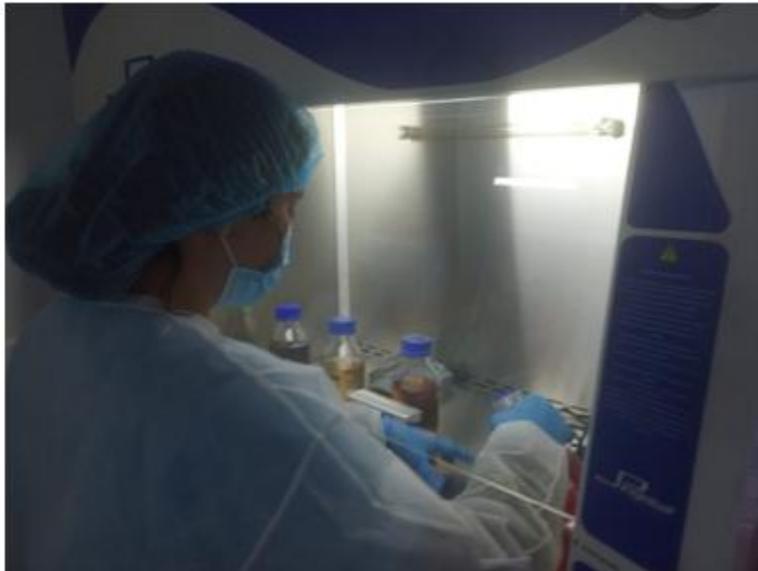


Imagen 17. Estandarización del inóculo en cabina de bioseguridad

Los procesos se realizaron teniendo en cuenta el nivel de contaminación que se podría presentar en el ambiente, por lo tanto; en primera medida se tuvo en cuenta el proceso de productividad con la inoculación de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 a un nivel de concentración microbiana de un McFarland de 0,5 seguido de una serie de diluciones hasta la dilución 8.

La siembra del microorganismo target en los cuatro medios de cultivo de interés se realizó desde el tubo sin dilución (es decir un Mcfarland 0,5) hasta la dilución 10^{-8} ,

En las tablas 9 a 12 se observan los resultados de crecimiento tras el periodo de incubación.

Tabla 9. Crecimiento de *Candida albicans* en medio extracto de malta – estandarización

<i>Candida albicans</i>	Extracto de malta		Promedio	Unidad log
MC 0.5 (10^8)	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-1}	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-2}	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-3}	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-4}	280	218	249	2.40
10^{-5}	32	25	28.5	1.45
10^{-6}	1	5	3	0.48
10^{-7}	0	0	0	N.C

Tabla 10. Crecimiento de *Candida albicans* en medio DRBC – estandarización

<i>Candida albicans</i>	DRBC		Promedio	Unidad log
MC 0.5 (10^8)	INCONTABLE	INCONTABLE	N. A	N.A
10^{-1}	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-2}	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-3}	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-4}	329	297	313	2.50
10^{-5}	31	35	33	1.52
10^{-6}	14	15	14.5	1.16
10^{-7}	4	2	3	0.48

Tabla 11. Crecimiento de *Candida albicans* en medio Sabouraud + Cloranfenicol – estandarización.

<i>Candida albicans</i>	Saboraud + Cloranfenicol		Promedio	Unidad log
MC 0.5 (10^8)	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-1}	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-2}	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-3}	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-4}	285	267	276	2.44
10^{-5}	40	28	34	1.53
10^{-6}	1	4	2.5	0.40
10^{-7}	1	1	1	0.00

Tabla 12. Crecimiento de *Candida albicans* en medio DG -18 – estandarización.

<i>Candida albicans</i>	DG - 18		Promedio	Unidad log
MC 0.5 (10-8)	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻¹	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻²	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻³	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻⁴	248	232	240	2.38
10 ⁻⁵	24	33	28.5	1.45
10 ⁻⁶	1	3	2	0.30
10 ⁻⁷	0	0	0	N.C

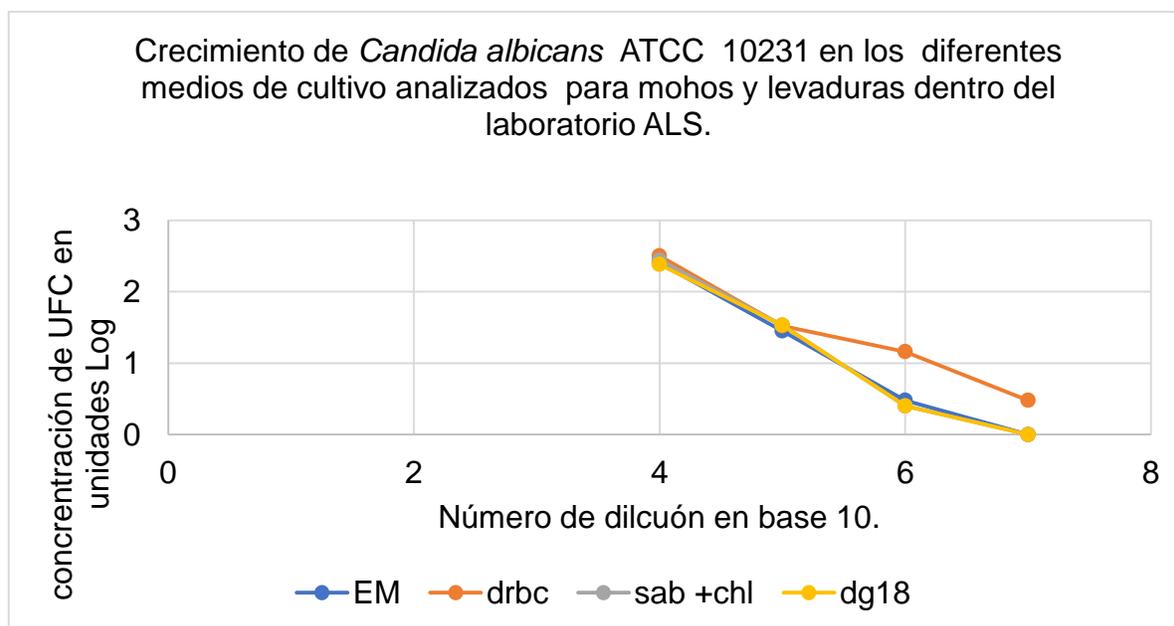
Donde:

N.A: No aplica

N.C: No cumple

Para observar mejor el comportamiento del *C. albicans* en los diferentes medios; se presentan los resultados por medio de una gráfica en donde se confronta el número de la dilución por la cual fue hecha a partir del McFarland de 0,5 frente a la unidad logarítmica del recuento en placa del microorganismo en cada medio que se pudo contar.

Gráfica 1. Crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231 en diferentes medios de cultivo.



	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
Extracto de malta	0	0,48	1,45	2,4
DRBC	0,48	1,16	1,52	2,5
Sabouraud +Cloranfenicol	0	0,4	1,53	2,44
DG-18	0	0,4	1,53	2,38

A partir de un Mcfarland de 0,5 se logró apreciar por conteo estimado en recuento en placa; los valores de UFC que se encontraban dentro del rango establecido en la ISO 11133:2014 (10-100 UFC) para poder realizar el proceso de estandarización. Teniendo en cuenta lo anterior, los valores que se encontraban dentro del rango correspondían a la quinta dilución seriada frente al Mcfarland inicial, es decir a una concentración de $n \cdot 10^{-5}$ UFC. En esta ocasión, todos los medios usados para evaluar su vida útil arrojaron resultados muy similares en cuanto al crecimiento obtenido en esta dilución, manteniéndose en la misma unidad logarítmica del recuento en placa del microorganismo en cada medio.

Analizando los resultados, hubo correlación entre las diluciones realizadas y la unidad logarítmica del crecimiento en recuento en placa, de esta manera se puede evidenciar que hay confianza entre los valores arrojados y las buenas prácticas de laboratorio para evitar contaminaciones y errores aleatorios que puedan afectar los resultados.

Candida albicans al ser una levadura, su proceso de reproducción varía frente al de una bacteria al no mantener una reproducción de fisión binaria, por lo que no se puede determinar en una ecuación matemática su comportamiento habitual, de esta manera el proceso de estandarización se convierte en un proceso mucho más complejo y es por ello que mantener un valor de crecimiento similar a una bacteria es casi nulo, por lo que se requiere evaluar el crecimiento dentro de cada una de las diluciones para conocer su comportamiento.

Sin embargo, para tener un punto de partida constante, se decidió trabajar con el valor de la densidad óptica del tubo que contenía las colonias de la levadura. A continuación se realizó la estandarización del inóculo de la cepa target *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 con una fecha de producción del 8 de febrero del 2021 a un Mcfarland del 0,5 manteniendo las diluciones hasta la 10^{-7} .

Los resultados se muestran en las tablas 13 a la 16.

Tabla 13. Crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* en medio extracto de malta – estandarización.

<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Extracto de malta		Promedio	Unidad log
MC 0.5 (10-8)	INCONTABLE	INCONTABLE	N. A	N.A
10^{-1}	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-2}	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-3}	37	43	40	1.6
10^{-4}	5	5	5	0.70
10^{-5}	2	2	2	0.30
10^{-6}	0	0	0	N.C
10^{-7}	0	0	0	N.C

Tabla 14. Crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* en medio DRBC– estandarización.

<i>Aspergillus brasiliensis</i>	DRBC		Promedio	Unidad log
MC 0.5 (10-8)	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-1}	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-2}	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10^{-3}	72	51	61.5	1.8
10^{-4}	0	11	10	1.00
10^{-5}	0	1	1	0.00
10^{-6}	0	0	0	N.C
10^{-7}	0	0	0	N.C

Tabla 15. Crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* en medio Sabouraud-Cloranfenicol – estandarización.

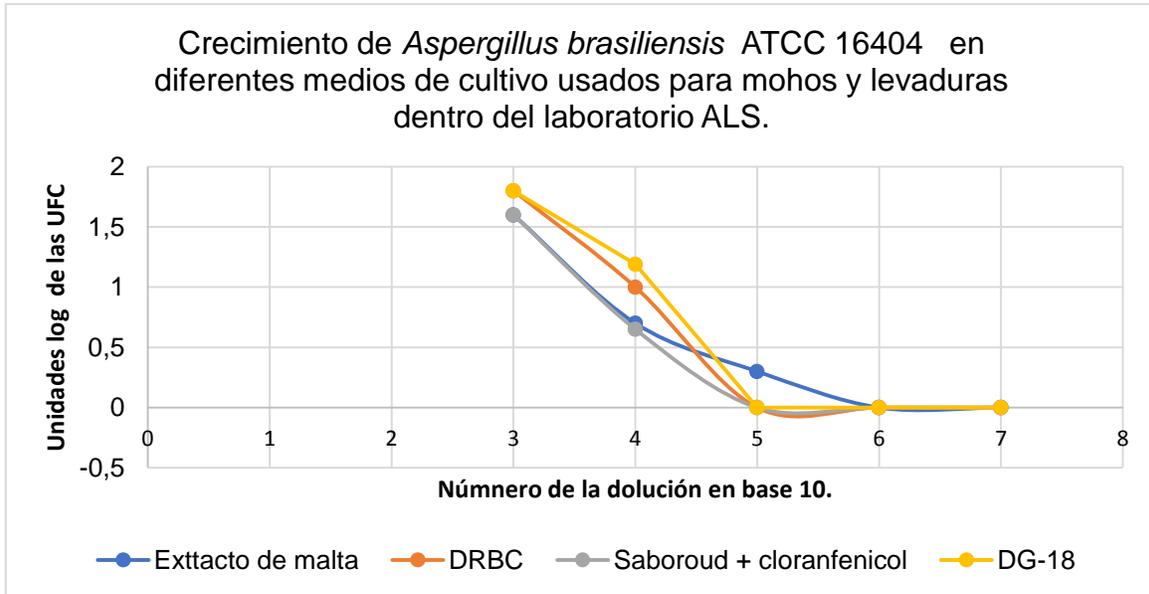
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Sabouraud + Cloranfenicol		Promedio	Unidad log
MC 0.5 (10-8)	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻¹	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻²	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻³	31	40	35.5	1.6
10 ⁻⁴	4	5	4.5	0.65
10 ⁻⁵	1	0	0.5	0
10 ⁻⁶	1	0	0.5	0
10 ⁻⁷	0	0	0	N.C

Tabla 16. Crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* en medio DG-18 – estandarización.

<i>Aspergillus brasiliensis</i>	DG-18		Promedio	Unidad log
MC 0.5 (10-8)	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻¹	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻²	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻³	65	57	61	1.8
10 ⁻⁴	15	16	15.5	1.19
10 ⁻⁵	0	1	0.5	-0.30
10 ⁻⁶	0	0	0	N.C
10 ⁻⁷	0	0	0	N.C

Los resultados obtenidos fueron expresados en la gráfica 2, teniendo en cuenta sólo las últimas cuatro diluciones de acuerdo al conteo visible que se podía obtener de esta cepa. El comportamiento de la cepa en los cuatro medios de cultivo se vio representados en diferentes colores, de esta manera se podría evaluar las diferencias entre cada una de ellas como se muestra a continuación.

Gráfica 2. Crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 en los cuatro medios de cultivo a evaluar.



	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
Extracto de malta	0	0	0,3	0,7	1,6
DRBC	0	0	0	1	1,8
Sabouraud + Cloranfenicol	0	0	0	0,65	1,6
DG-18	0	0	0	1,19	1,8

De acuerdo a los resultados obtenidos, los valores que más se ajustaban al rango establecido para un conteo de crecimiento se encuentran en la dilución tercera para todos los medios de cultivo a analizar, por este motivo a partir de esta dilución se estandariza el valor aproximado por el cual se debe mantener la productividad de este microorganismo en cada uno de los medios.

6.6.1 ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO DE LA CEPA NO TARGET.

Para el caso de *Escherichia coli*, la cepa NO target; al inocularlo en los diferentes medios de cultivo, se obtuvieron los siguientes resultados que se reflejan en las siguientes tablas.

En primera medida se realiza un crecimiento de esta cepa en un medio óptimo como referencia con el fin de evaluar su crecimiento y el nivel de recuperación que usualmente se tiene al enfrentar al microorganismo en óptimas condiciones (ver tabla 17).

Tabla 17. Crecimiento de *Escherichia coli* en medio TSA– estandarización.

<i>Escherichia coli</i>	TSA		Promedio	Unidad log
MC 0.5 (10 ⁻⁸)	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻¹	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻²	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻³	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻⁴	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻⁵	960	1070	1015	3.01
10 ⁻⁶	115	142	128.5	2.11
10 ⁻⁷	18	15	16.5	1.22

Así mismo se realizó la siembra en los cuatro medios de cultivo a evaluar y se obtuvieron los resultados mostrados en las tablas 18 a 21.

Tabla 18. Crecimiento de *Escherichia coli* en medio extracto de malta – estandarización.

<i>Escherichia coli</i>	Extracto de malta		Promedio	Unidad log
MC 0.5 (10 ⁻⁸)	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻¹	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻²	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻³	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻⁴	INCONTABLE	INCONTABLE	N.A	N.A
10 ⁻⁵	1012	980	996	3.0
10 ⁻⁶	108	72	90	2.0
10 ⁻⁷	12	17	14.5	1.2

Tabla 19. Crecimiento de *Escherichia coli* en medio Sabouraud + Cloranfenicol – estandarización.

Escherichia coli	Sabouraud + Cloranfenicol		Promedio	Unidad log
MC 0.5 (10 ⁻⁸)	0	0	0	N.C
10 ⁻¹	0	0	0	N.C
10 ⁻²	0	0	0	N.C
10 ⁻³	0	0	0	N.C
10 ⁻⁴	0	0	0	N.C
10 ⁻⁵	0	0	0	N.C
10 ⁻⁶	0	0	0	N.C
10 ⁻⁷	0	0	0	N.C

Tabla 20. Crecimiento de *Escherichia coli* en medio DG -18 – estandarización.

Escherichia coli	DG - 18		Promedio	Unidad log
MC 0.5 (10 ⁻⁸)	0	0	0	N.C
10 ⁻¹	0	0	0	N.C
10 ⁻²	0	0	0	N.C
10 ⁻³	0	0	0	N.C
10 ⁻⁴	0	0	0	N.C
10 ⁻⁵	0	0	0	N.C
10 ⁻⁶	0	0	0	N.C
10 ⁻⁷	0	0	0	N.C

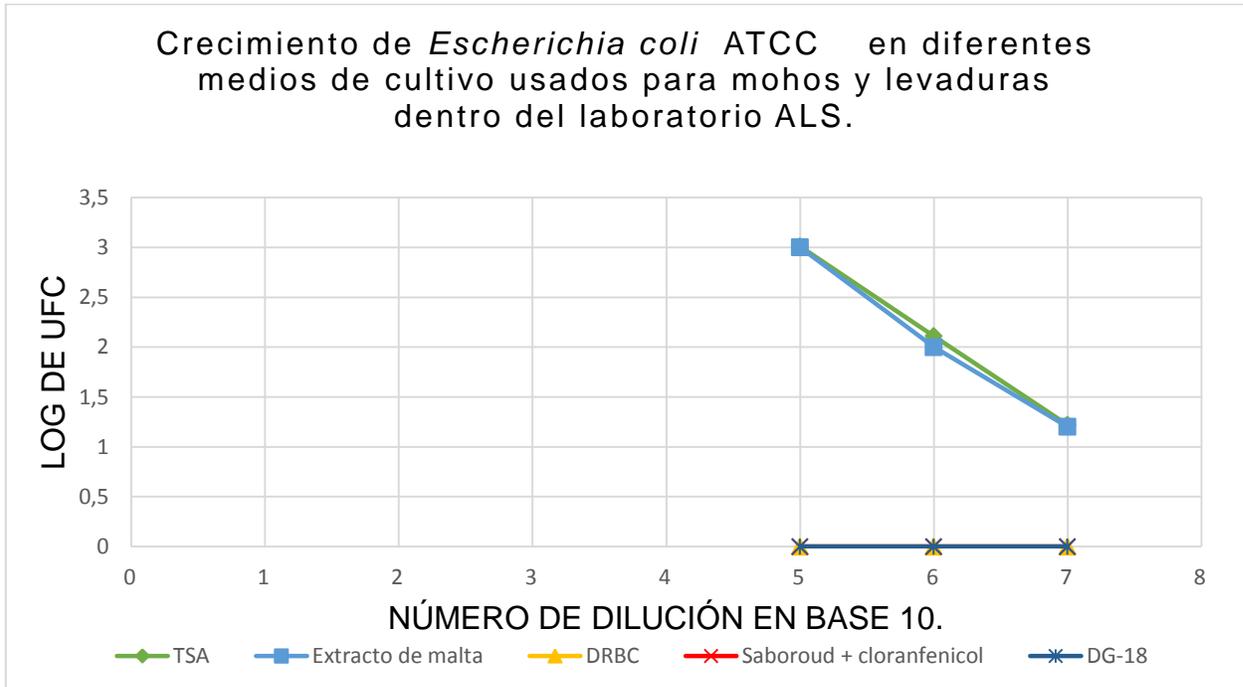
Tabla 21. Crecimiento de *Escherichia coli* en medio DRBC – estandarización.

Escherichia coli	DRBC		Promedio	Unidad log
MC 0.5 (10 ⁻⁸)	0	0	0	N.C
10 ⁻¹	0	0	0	N.C
10 ⁻²	0	0	0	N.C
10 ⁻³	0	0	0	N.C
10 ⁻⁴	0	0	0	N.C
10 ⁻⁵	0	0	0	N.C
10 ⁻⁶	0	0	0	N.C
10 ⁻⁷	0	0	0	N.C

Como se observa en las tablas anteriores, la bacteria no tuvo crecimiento en las diferentes diluciones seriadas de un McFarland de 0,5 en tres de los cuatro medios a trabajar. En aquella que presentó un alto crecimiento (agar extracto de malta) se comparó frente a los otros medios analizados y frente al medio de cultivo

óptimo para el crecimiento de esta bacteria mediante la gráfica 3 la cual se presenta a continuación.

Gráfica 3. Evaluación del crecimiento de *Escherichia coli* en los diferentes medios de cultivo usados para el crecimiento de mohos y levaduras.



	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
TSA	3,01	2,11	1,22
Extracto de malta	3	2	1,2
DRBC	0	0	0
Saboraud + cloranfenicol	0	0	0
DG-18	0	0	0

Los resultados obtenidos para el inhibir el crecimiento de esta bacteria son satisfactorios en tres de los cuatro medios evaluados. Partiendo de los conceptos teóricos respecto a la composición de los medios, es claro que todos ellos manejan un componente activo que permite inhibir la carga bacteriana

acompañante que pueda afectar al rendimiento y crecimiento de los mohos y levaduras de interés, con excepción del medio extracto de malta ya que dentro de su composición no presenta este agente inhibidor.

Es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos de las UFC se comparan con los resultados en el medio de referencia, puesto que este, tiene como objetivo recuperar o mantener un mejor rendimiento de productividad del microorganismo target en cuestión; para este caso el medio agar TSA, facilitando la recuperación de *Escherichia coli* para evaluar qué tan eficaz es el proceso de selectividad que presenta el medio.

De acuerdo a la norma ISO 11133 del 2014 para evaluar la selectividad del medio, el inóculo apropiado del microorganismo no-target al momento de sembrarlo, deberá estar entre un rango de 10^4 a 10^6 UFC.

El acelerado proceso de reproducción asexual que posee esta bacteria, permite que el porcentaje de recuperación sea mayor en comparación a otros microorganismos cuando cuenta con todos los requerimientos básicos para su crecimiento, por tanto, debido a sus características, es un punto de referencia como microorganismo no target. *E. coli* se reproduce por fisión binaria, durante este tipo de reproducción asexual, la única molécula de ADN se replica y ambas copias se adhieren, en diferentes puntos, a la membrana celular. A medida que la célula comienza a crecer y alargarse, aumenta la distancia entre las dos moléculas de ADN. Una vez que la bacteria casi duplica su tamaño original, la membrana celular comienza a pellizcarse hacia adentro en el centro. Finalmente, se forma una pared celular que separa las dos moléculas de ADN y divide la célula original en dos células hijas idénticas. (Reece y Campbell, 2011).

Al encontrarse en un medio como el extracto de malta rica en maltosa como fuente de energía, la peptona como fuente de nitrógeno y la glicerina como fuente de carbono, tendrá todos los elementos básicos para poder realizar su metabolismo, de esta manera su crecimiento no se verá afectado tal y como se muestra en la gráfica 3. Esto se debe a que el medio una vez esterilizado no es ajustado su pH a uno más ácido, permitiendo que la bacteria pueda crecer en esta.

Cabe resaltar que el motivo por el cuál no se realiza el ajuste del pH es debido a que el proceso realizado dentro de la empresa no comprende este paso; por lo tanto, se evaluó su proceso de esta manera. Este resultado permite evidenciar la falla dentro del proceso manejado permitiendo dar discusión y como sugerencia para el desarrollo de los siguientes trabajos el ajuste del pH con alguna solución tampón ácida o la dispuesta por la casa comercial (ácido láctico X037).

Sin dejar a un lado la inocuidad y evaluar el buen desarrollo durante el proceso, se tuvo en cuenta los valores fisicoquímicos para determinar la calidad del medio, además de realizar los respectivos controles.

6.7 RESULTADOS DE CONTROLES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS

6.7.1 CONTROL NEGATIVO

En la tabla 22 e imagen 18 se presentan los resultados del control negativo realizado a los medios de cultivo DRBC, Sabouraud + cloranfenicol, DG-18 y extracto de malta.

Tabla 22. Control negativo de los medios de cultivo

MEDIOS DE CULTIVO	CONTROL NEGATIVO
DRBC	Sin crecimiento
Sabouraud + cloranfenicol	Sin crecimiento
DG-18	Sin crecimiento
Extracto de malta	Sin crecimiento

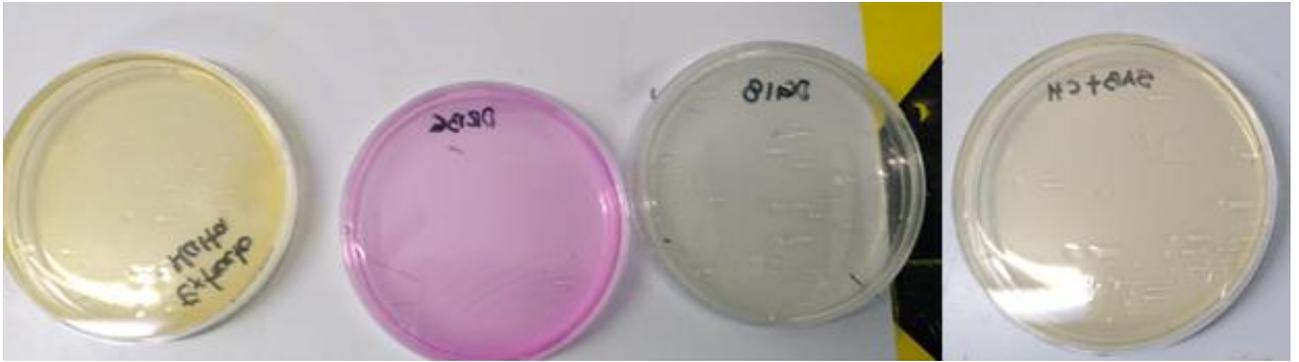


Imagen 18. Resultados control negativo en los medios de cultivo

6.7.2 PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS

En cuanto a las propiedades físico químicas de los diferentes medios utilizados, se encontraron en óptimas condiciones respecto al color, apariencia, consistencia del gel y pH como se observa en el anexo F.

6.8 RESULTADOS PARA EVALUAR LA VIDA ÚTIL DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los resultados que se obtienen para evaluar la vida útil de los medios de cultivo se realizan en un periodo de 6 días como máximo, debido a que durante el desarrollo laboral el nivel de muestras a procesar demanda una gran cantidad de medio para poder realizar el proceso de incubación de cada muestra, por este factor y por la poca capacidad de espacio dentro de la incubadora, fueron los motivos primordiales para tomar este periodo de tiempo.

6.8.1 RESULTADOS DURANTE 6 DÍAS DE LA PRODUCTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

6.8.1.1 PRODUCTIVIDAD DE CANDIDA ALBICANS

Tabla 23. Productividad de *Candida albicans* primer día.

<i>Candida albicans</i> productividad	Primer día UFC		Promedio	U Log
Extracto de malta	43	39	41	1,61
Sabouraud cloranfenicol	35	40	37,5	1,57
DRBC	36	40	38	1,58
DG-18	45	37	41	1,61

Tabla 24. Productividad de *Candida albicans* segundo día

<i>Candida albicans</i> productividad	Segundo día		Promedio	U Log
Extracto de malta	41	40	40,5	1,61
Sabouraud cloranfenicol	37	38	37,5	1,57
DRBC	39	38	38,5	1,59
DG-18	41	40	40,5	1,61

Tabla 25. Productividad de *Candida albicans* tercer día.

<i>Candida albicans</i> productividad	Tercer día UFC		Promedio	U Log
Extracto de malta	40	38	39	1,59
Sabouraud cloranfenicol	32	32	32	1,51
DRBC	34	40	37	1,57
DG-18	34	46	40	1,60

Tabla 26. Productividad de *Candida albicans* cuarto día.

<i>Candida albicans</i> productividad	Cuarto día UFC		Promedio	U Log
Extracto de malta	33	43	38	1,58
Sabouraud cloranfenicol	26	28	27	1,43
DRBC	41	27	34	1,53
DG-18	37	32	34,5	1,54

Tabla 27. Productividad de *Candida albicans* quinto día.

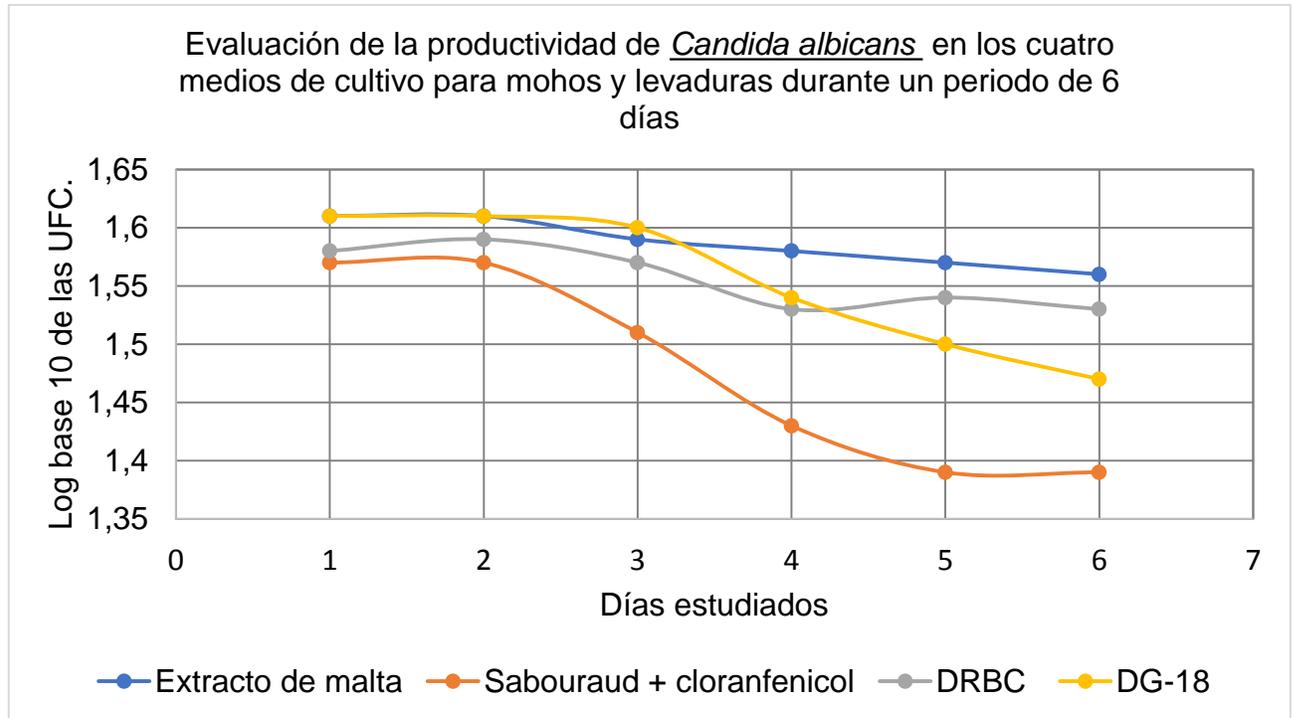
<i>Candida albicans</i> productividad	Quinto día UFC		Promedio	U Log
Extracto de malta	35	39	37	1,57
Saboraud cloranfenicol	25	24	24,5	1,39
DRBC	34	36	35	1,54
DG-18	32	31	31,5	1,50

Tabla 28. Productividad de *Candida albicans* sexto día.

<i>Candida albicans</i> productividad	Sexto día UFC		Promedio	U Log
Extracto de malta	37	35	36	1,56
Sabouraud cloranfenicol	22	27	24,5	1,39
DRBC	35	33	34	1,53
DG-18	32	27	29,5	1,47

En la gráfica 4 se evidencia el comportamiento del crecimiento de esta levadura los días 1, 2, 3, 4, 5 y 6 en los cuatro medios analizados en unidades logarítmicas.

Gráfica 4. Evaluación de la productividad de *Candida albicans* en los cuatro medios de cultivo durante un tiempo de 6 días.



Para determinar si se mantiene la calidad de estos medios selectivos, se tiene en cuenta la prueba de desempeño; la cual determina mediante una relación de UFC entre el medio sometido a prueba versus el medio de cultivo de referencia. De acuerdo al resultado obtenido, se determina si el medio de cultivo mantiene su vida útil.

Teniendo en cuenta la norma ISO 11133 del año 2014, los medios de cultivo de referencia son aquellos que han sido evaluados anteriormente y han salido satisfactorios en los análisis de productividad y selectividad. En este caso, el medio de cultivo de referencia será el mismo medio agar que se estará evaluando debido a que no hay registros en la empresa respecto a la evaluación de estos medios. El primer día de inoculación se tendrá como valor de referencia y el valor del N0 que se tendrá en cuenta para conocer la productividad de los medios, es el

promedio de las UFC de *Candida albicans* de la dilución 10-5 que se dispone en la tabla N°16 productividad de *Candida albicans* primer día.

Para el caso de *Aspergillus brasiliensis* el N0 que se tendrá en cuenta, es el promedio de las UFC de la dilución 10-3 durante el primer día de evaluación; ver Tabla 21. Productividad de *Aspergillus brasiliensis* primer día

Productividad (PR):

Microorganismo target: (10-100 UFC) 10^2

PR = NS/NO

NS: Recuento total de colonias obtenidas en el medio de cultivos sometido a las pruebas

NO: Recuento total de colonias obtenidos en el medio de cultivo de referencia.

Las tablas 29 a la 32 presentan los valores de desempeño de productividad de los diferentes medios usando como inóculo *Candida albicans*.

Tabla 29. Productividad de *Candida albicans* en medio extracto de malta.

Medio de cultivo extracto de malta desempeño de productividad					
1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día
41/41 = 1	41/41=1	39/41= 0,95	38/41= 0,92	37/41=0,90	36/41=0,87

Tabla 30. Productividad de *Candida albicans* en medio DRBC

Medio de cultivo DRBC desempeño de productividad					
1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día
38/38= 1	39/38=1,02	37/38=0,97	34/38=0,89	35/38=0,92	34/38=0,89

Tabla 31. Productividad de *Candida albicans* en medio DG-18

Medio de cultivo DG-18 desempeño de productividad					
1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día
41/41=1	41/41=1	40/41=0,97	35/41=0,85	32/41=0,78	30/41=0,73

Tabla 32. Productividad de *Candida albicans* en medio Sabouraud + Cloranfenicol

Medio de cultivo Sabouraud + cloranfenicol desempeño de productividad					
1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día
38/38=1	38/38=1	32/38=0,84	27/38=0,71	25/38=0,65	25/38=0,65

Cada medio de cultivo, fue evaluado conforme a su misma referencia ya que la norma lo permite. Por lo tanto, si el medio es selectivo deberá ser evaluado en comparación con un medio selectivo. Para el caso del medio no selectivo este deberá ser evaluado por un medio no selectivo.

Según la norma ISO 11133 del 2014, para que un medio selectivo cumpla con su rendimiento, deberá tener una relación de productividad como mínimo de 0,5; mientras que para un medio no selectivo su relación deberá ser de 0,7.

Con base a lo anterior; los tres medios selectivos usados en el laboratorio para el crecimiento de mohos y levaduras, cumplieron con el desempeño de productividad durante los 6 días a evaluar ya que se encontraban dentro del rango del límite inferior pudiendo demostrar que su proceso de recuperación era conforme, por lo tanto, el medio era apto para su uso para la recuperación de la cepa target.

En cuanto al medio de cultivo no selectivo (Extracto de malta), la relación correspondiente fue satisfactoria debido a que se encontraba por encima del límite inferior establecido para el caso de la cepa target (levadura).

6.8.1.2 PRODUCTIVIDAD DE *Aspergillus brasiliensis*

En las tablas 33 a 38 se presentan los resultados del crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* durante un periodo de 6 días.

Tabla 33. Productividad de *Aspergillus brasiliensis* primer día.

<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Primer día UFC		Promedio	U Log
Extracto de malta	41	47	44	1,64
Sabouraud + cloranfenicol	47	42	44,5	1,65
DRBC	28	25	26,5	1,42
DG-18	27	44	35,5	1,55

Tabla 34. Productividad de *Aspergillus brasiliensis* segundo día.

<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Segundo día UFC		Promedio	U Log
Extracto de malta	45	47	46	1,66
Sabouraud + cloranfenicol	47	43	45	1,65
DRBC	29	25	27	1,43
DG-18	34	32	33	1,52

Tabla 35. Productividad de *Aspergillus brasiliensis* tercer día.

<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Tercer día UFC		Promedio	U Log
Extracto de malta	50	58	54	1,73
Sabouraud + cloranfenicol	56	58	57	1,75
DRBC	25	22	23,5	1,37
DG-18	30	37	33,5	1,53

Tabla 36. Productividad de *Aspergillus brasiliensis* cuarto día.

<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Cuarto día UFC		Promedio	U Log
Extracto de malta	25	40	32,5	1,51
Sabouraud + cloranfenicol	16	30	23	1,36
DRBC	21	20	20,5	1,31
DG-18	24	37	30,5	1,48

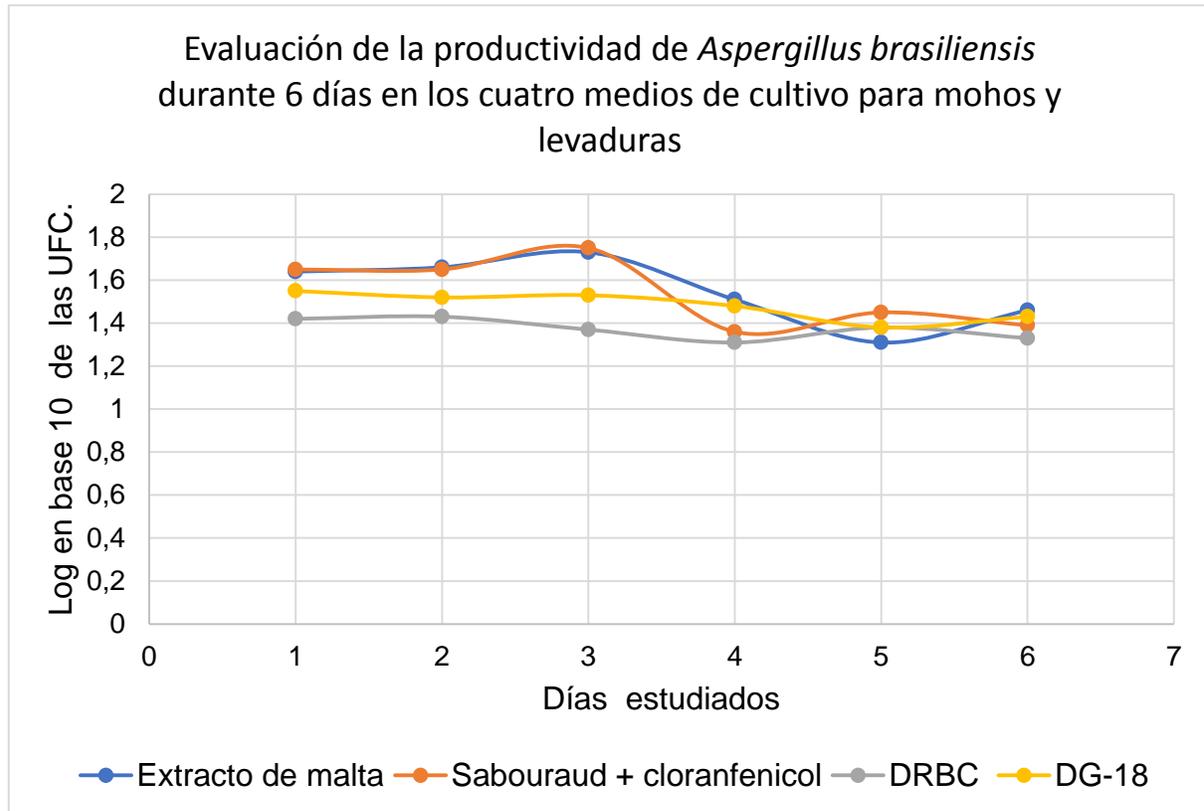
Tabla 37. Productividad de *Aspergillus brasiliensis* quinto día.

<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Quinto día UFC		Promedio	U Log
Extracto de malta	19	22	20,5	1,31
Saboraud + cloranfenicol	24	33	28,5	1,45
DRBC	20	28	24	1,38
DG-18	28	20	24	1,38

Tabla 38. Productividad de *Aspergillus brasiliensis* sexto día.

<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Sexto día UFC		Promedio	U Log
Extracto de malta	22	36	29	1,46
Sabouraud + cloranfenicol	21	28	24,5	1,39
DRBC	24	19	21,5	1,33
DG-18	37	17	27	1,43

Gráfica 5: Productividad de *Aspergillus brasiliensis* en los cuatro medios de cultivo durante un periodo de 6 días.



Fue necesario graficar los datos para evaluar el comportamiento de recuperación del microorganismo en los diferentes medios de cultivo, de esta manera se logra apreciar que, en el cuarto día, el medio de cultivo redujo su potencial de productividad en los cuatro medios, y a partir de este, mantuvo valores de crecimiento muy similar. El medio de cultivo que tuvo mayor reducción en la recuperación del microorganismo fue el medio Sabouraud más cloranfenicol agar teniendo en cuenta el punto inicial de partida.

En las tablas 39 a 42, se presentan los valores de desempeño de productividad de los diferentes medios usando como inóculo *Aspergillus brasiliensis*.

Tabla 39. Productividad *Aspergillus brasiliensis* en medio extracto de malta.

Medio de cultivo Extracto de malta desempeño de productividad					
1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día
44/44 = 1	46/44=1,04	54/44= 1,22	33/44= 0,75	21/44=0,47	29/44=0,65

Tabla 40. Productividad *Aspergillus brasiliensis* en medio DRBC

Medio de cultivo DRBC desempeño de productividad					
1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día
27/27= 1	27/27=1	24/27=0,88	21/27=0,77	24/27=0,88	22/27=0,81

Tabla 41. Productividad *Aspergillus brasiliensis* en medio DG-18

Medio de cultivo DG-18 desempeño de productividad					
1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día
36/36=1	33/36=0,91	34/36=0,94	31/36=0,86	24/36=0,66	27/36=0,75

Tabla 42. Productividad *Aspergillus brasiliensis* en medio Sabouraud + cloranfenicol

Medio de cultivo Sabouraud + cloranfenicol desempeño de productividad					
1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día
45/45=1	45/45=1	57/45=1,26	23/45=0,51	29/45=0,64	25/45=0,55

La productividad de estos medios en relación al crecimiento de este hongo difiere de los anteriores resultados enfocados a la cepa de *Candida albicans*, debido a que el proceso de reproducción del hongo *Aspergillus* varía al tener las dos clases de reproducción, de esta manera su crecimiento es mucho más complejo, El género *Aspergillus* comprende unos pocos cientos de especies que comparten una estructura común asexual formadora de esporas, el aspergillum. Aproximadamente un tercio de estas especies también producen una etapa sexual, todas menos cinco de las cuales se sabe que son homotáticas. Las etapas sexuales asociadas con *Aspergillus* se dividen en aproximadamente diez géneros diferentes, lo que refleja un tremendo grado de diversidad filogenética y

biológica (Geiser, 2008). Al mantener estos dos mecanismos para reproducirse permite que haya fluctuaciones con base a su crecimiento.

Con base a los resultados, tres de los cuatro medios analizados cumplieron con el desempeño de productividad durante un periodo de 6 días. Sin embargo, el medio Sabouraud más cloranfenicol a partir del cuarto día se encontraba muy cerca de los límites permitidos mientras que el medio extracto de malta a partir del día 5 se encontraba no conforme ya que pasaba el límite del desempeño de productividad.

6.8.2 SELECTIVIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Para este factor fue necesario tener en cuenta las consideraciones expuestas por la norma para el proceso de selectividad, donde; la cepa no target debe estar a una concentración entre 10^4 - 10^6 UFC, por tanto, fue necesario sembrar a partir de la segunda dilución de un McFarland de 0,5.

Debido a que hasta la cuarta dilución no es posible realizar un conteo por la cantidad de crecimiento, fue necesario adicionar la siembra en placa de la concentración 10^3 para así poder tener un conteo aproximado de cada medio.

En las tablas 43 a 48 se presentan sólo los resultados obtenidos en la quinta dilución, es decir, a una concentración de 10^3 UFC partiendo de un McFarland de 0,5, ya que el único medio de cultivo que presentó crecimiento fue el extracto de malta en las diferentes diluciones inoculadas.

6.8.2.1 SELECTIVIDAD PARA *Escherichia coli*

Tabla 43. Selectividad de *Escherichia coli* primer día.

<i>Escherichia coli</i>	Día 1 (UFC)		Promedio (UFC)
DG18	0	0	0
DRBC	0	0	0
Extracto de malta	1020	921	971
Sabouraud cloranfenicol	0	0	0

Tabla 44. Selectividad de *Escherichia coli* segundo día.

<i>Escherichia coli</i>	2 día (UFC)		Promedio (UFC)
DG18	0	0	0
DRBC	0	0	0
Extracto de malta	1011	1008	1009,5
Sabouraud cloranfenicol	0	0	0

Tabla 45. Selectividad de *Escherichia coli* tercer día.

<i>Escherichia coli</i>	Día 3 (UFC)		Promedio (UFC)
DG18	0	0	0
DRBC	0	0	0
Extracto de malta	1005	990	997,5
Sabouraud cloranfenicol	0	0	0

Tabla 46. Selectividad de *Escherichia coli* cuarto día.

<i>Escherichia coli</i>	Día 4 (UFC)		Promedio (UFC)
DG18	0	0	0
DRBC	0	0	0
Extracto de malta	912	930	921
Sabouraud cloranfenicol	0	0	0

Tabla 47. Selectividad de *Escherichia coli* quinto día.

<i>Escherichia coli</i>	5 día (UFC)		Promedio (UFC)
DG18	0	0	0
DRBC	0	0	0
Extracto de malta	925	1002	963,5
Sabouraud cloranfenicol	0	0	0

Tabla 48. Selectividad de *Escherichia coli* sexto día.

<i>Escherichia coli</i>	6 día (UFC)		Promedio (UFC)
DG18	0	0	0
DRBC	0	0	0
Extracto de malta	948	950	949
Sabouraud cloranfenicol	0	0	0

Además de la productividad evaluada en los diferentes medios, se debe determinar su selectividad para el microorganismo NO target, de esta manera se conoce el desempeño de cada uno de estos medios trabajados.

A continuación, se tiene los siguientes parámetros:

Selectividad (SF)

Para la siembra, el inóculo apropiado del microorganismo no-target debe estar entre un rango de: 10^4 a 10^6 UFC del microorganismo definido

SF = DO - DS

DO: Es la dilución más alta que muestra el crecimiento en el medio de cultivo de referencia no selectivo.

DS: Es la dilución más alta que muestra un crecimiento comparable en el medio de prueba selectivo.

SF, DO, y DS se expresan en unidades log base 10.

Nota: La SF de microorganismos no objetivo en un medio de cultivo selectivo debe ser al menos 2.

Teniendo en cuenta lo anterior, el Do: será el valor promedio del crecimiento de la quinta dilución del medio de cultivo de referencia (TSA).

Tabla 49. Desempeño del medio de cultivo extracto de malta con base a su selectividad.

Desempeño del medio de cultivo Extracto de malta con base a su selectividad					
1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día
$S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(971)$	$S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1010)$	$S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(998)$	$S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(998)$	$S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(964)$	$S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(949)$
$S_F = 0,02$	$S_F = 0,002$	$S_F = 0,007$	$S_F = 0,007$	$S_F = 0,022$	$S_F = 0,03$

Tabla 50. Desempeño del medio de cultivo DRBC con base a su selectividad

Desempeño del medio de cultivo DRBC con base a su selectividad					
1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día
$S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$	$S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$	$S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$	$S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$	$S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$	$S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$
$S_F = 3$	$S_F = 3$	$S_F = 3$	$S_F = 3$	$S_F = 3$	$S_F = 3$

Tabla 51. Desempeño del medio de cultivo DG-18 con base a su selectividad.

Desempeño de medio de cultivo DG-18 con base a su selectividad					
1 día $S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$	2 día $S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$	3 día $S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$	4 día $S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$	5 día $S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$	6 día $S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$
$S_F = 3$	$S_F = 3$	$S_F = 3$	$S_F = 3$	$S_F = 3$	$S_F = 3$

Tabla 52. Desempeño del medio de cultivo SABOURAUD + CLORANFENICOL con base a su selectividad.

Desempeño del medio de cultivo Sabouraud + cloranfenicol con base a su selectividad					
1 día $S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$	2 día $S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$	3 día $S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$	4 día $S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$	5 día $S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$	6 día $S_F = \log_{10}(1015) - \log_{10}(1)$
$S_F = 3$	$S_F = 3$	$S_F = 3$	$S_F = 3$	$S_F = 3$	$S_F = 3$

Evaluando el factor de desempeño de selectividad en cada uno de los medios de cultivo usados en el laboratorio para el crecimiento de mohos y levaduras, se determina que:

El 75% de los medios cumplieron con este factor durante los 6 días de prueba, dando una confianza en los diferentes procesos, tales como: preparación del medio, desempeño del mismo, y calidad en el producto ofrecido por la casa comercial correspondiente a cada uno de estos medios. Los agentes inhibidores comprendidos en el medio DRBC el dichloran y el agente rosa de bengala permitieron solo el crecimiento del inóculo de la cepa target. Específicamente el agente rosa, actuó frente a la no proliferación de *Escherichia coli* dándonos como resultado 0 UFC y un desempeño de selectividad mayor a 2, en este caso el 100%.

Al igual que el DRBC, el medio DG-18 y el medio Sabouraud + cloranfenicol obtuvieron 0 UFC de la cepa no target a raíz de la incorporación del antibiótico termoestable Cloranfenicol en el medio.

El medio de extracto de malta fue el único que presentó crecimiento abundante, casi igual al crecimiento del medio de referencia para la cepa no target. Por este motivo como fue mencionado anteriormente, el medio deberá contar con un apoyo de un agente que permita reducir la proliferación de carga bacteriana y en lo posible eliminarla completamente. Según lo recomendado por la casa comercial deberá ser un ácido para reducir el pH del medio.

6.9 RESULTADOS DE LAS PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los resultados de los factores físico químicos evaluados durante los 6 días se encuentran en el anexo G al L.

El color es la propiedad física permite mostrar la calidad en la que se encuentra el medio, de esta manera se logra asociar los diferentes en cambios como el pH, la temperatura que pueden afectar la coloración del mismo. Visualmente se logró apreciar cambios a partir del cuarto día en los medios de Sabouraud más cloranfenicol y extracto de malta con un tono mayormente caramelizado y oscuro.

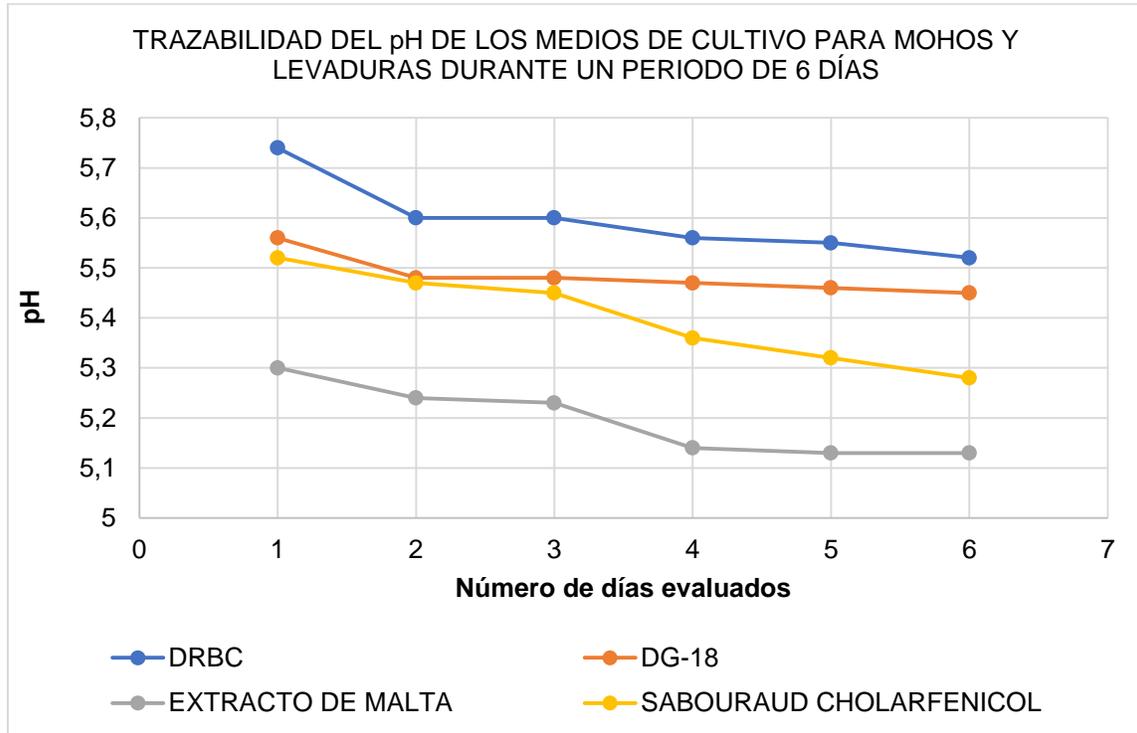
En cuanto a la consistencia de gel, se mantuvo durante los seis días en los medios DRBC, DG-18 y Sabouraud más cloranfenicol. Por el contrario, el medio extracto de malta dejó de presentar una consistencia firme a partir del cuarto día tras evaluar la calidad del agar. Por lo tanto, el medio se trabajó con el mayor cuidado posible para realizar los análisis y las siembras en los días restantes.

La apariencia es un factor que implica el reconocimiento de partículas en suspensión, cambios en el agar por grumos y/o contaminación por la manipulación diaria del medio. Pese a no tener contaminación cruzada, se presentaron grumos en la parte inferior del frasco debido a los cambios permanentes en temperatura durante su uso a partir del cuarto día en los diferentes medios como se muestra en el anexo J.

Por otro lado, los controles diarios del ambiente y de cada uno de los medios se encontraban libres de partículas extrañas y de contaminación post-esterilización.

En la gráfica 6 se presenta el comportamiento de los medios de cultivo en relación al pH durante un periodo de 6 días.

Gráfica 6. Trazabilidad del pH de los medios del cultivo durante un periodo de 6 días



El metabolismo de los microorganismos está controlado por una amplia gama de variables ambientales, que incluyen el pH, la temperatura, la salinidad, la disponibilidad de nutrientes y las ubicaciones geográficas. Entre estos factores, el pH emerge como un control primario; posee una correlación con las comunidades microbianas en una amplia gama de condiciones biogeoquímicas (Thompson *et al.*, 2017). Además, las variaciones en el pH ambiental también inducen respuestas significativas de las actividades metabólicas de las comunidades naturales (Kotsyurbenko *et al.*, 2004).

Dentro de los análisis fisicoquímicos, el pH en los medios de cultivo juega un papel importante ya que dependiendo del interés del microorganismo target deberá mantener un pH ligeramente alcalino, neutro o ligeramente ácido para permitir darle las condiciones óptimas de crecimiento.

El pH afecta las condiciones ambientales que son relevantes para el crecimiento y la supervivencia microbiana. El pH describe la actividad química de los protones, un actor clave en las reacciones redox, la disolución, precipitación de minerales y otras reacciones geoquímicas. Estas reacciones determinan la salinidad y composición de las soluciones acuosas y controlan la biodisponibilidad de nutrientes y oligoelementos. Además, el pH también afecta las actividades de las enzimas extracelulares y la reactividad de la materia orgánica natural. De esta manera, el pH se convierte en un indicador de los entornos ambientales generales que dan forma a la composición y actividad de las comunidades microbianas (Lauber *et al.*, 2009).

Como se visualiza en la gráfica 6, con el transcurso de los días el pH de los diferentes medios disminuía en escala, aumentando su acidez. El medio DRBC tuvo un cambio bastante pronunciado entre el primer y segundo día bajando dos unidades decimales, sin embargo, pese a haber seguido disminuyendo con el paso de los días, este medio no pasó de los límites inferiores establecidos ($5,6 \pm 0,2$) y mantuvo el pH dentro de los límites permitidos hasta el sexto día. El medio DG-18, con un pH inicial de 5,56 tuvo al igual que el medio anterior un descenso pronunciado durante el día 2, manteniéndolo casi en el mismo valor hasta el sexto día. Este medio cumplió con los límites inferiores permitidos.

En el caso del medio Sabouraud con cloranfenicol, el pH se vio bastante afectado a partir del tercer día, ya que se encontraba en el límite inferior. A partir del cuarto día, el pH se encontró fuera del rango óptimo, incumpliendo con esta característica. El medio extracto de malta a diferencia de los anteriores medios debe estar entre un pH de $5,4 \pm 0,2$. No obstante, el valor inicial del pH fue de 5,3 manteniéndose dentro del rango como límite inferior hasta el tercer día.

De acuerdo a estos resultados, sólo el 50% de los medios cumplieron con los límites establecidos conforme al pH, por lo tanto, los medios (Sabouraud + cloranfenicol y Extracto de malta) que no cumplieron hasta la fecha objetivo, deberán ser conservados en menor tiempo en la incubadora de 55°C, es decir, hasta el tercer día como fecha límite. Además, en el cuarto día la productividad de estos dos medios disminuyó considerablemente hasta el punto de cruzar el límite inferior en base a su rendimiento. Por tal motivo, se determina que el pH tuvo incidencia dentro de estos resultados de manera significativa, evitando la recuperación ideal del microorganismo target.

Por este motivo es indispensable que, al momento de servir los medios, estos cuenten con las condiciones necesarias para mantener un buen rendimiento, en este caso, manteniendo los límites permitidos por la casa comercial para el pH del medio. El pH de los medios de cultivo se ajusta durante su fabricación a los valores descritos en cada uno de ellos. Sin embargo, la calidad del agua que se utiliza en su hidratación, la utilización de medios no recientes, etc., pueden modificar este parámetro por lo que es aconsejable verificarlo y reajustarlo si fuera necesario.

En algunos casos se puede ajustar el pH después de la esterilización de forma aséptica y utilizando soluciones ácidas (Ácido Clorhídrico) o básicas (Sodio Hidróxido) estériles. En los medios sólidos la medida se hace a 45-50°C (el agar todavía no ha gelificado).

La tabla 53 muestra el desempeño de los medios DRBC, DG-18, Sabouraud + cloranfenicol y Extracto de malta durante 6 días.

Tabla 53. Resumen del desempeño de los medios DRBC, DG-18, Sabouraud + cloranfenicol y Extracto de malta durante un periodo de 6 días.

Medio de cultivo	Rendimiento de selectividad	Rendimiento de productividad	Factores fisicoquímicos	Esterilidad
DRBC	C	C	Cumple con el criterio.	C
DG-18	C	C	Cumple con el criterio.	C
SABOURAUD+ CLORANFENICOL	C	C	Cambio en la coloración, pH fuera del rango a partir del 4 día.	C
EXTRACTO DE MALTA	N. C	N.C a partir del 5 día.	Cambio en la coloración, pH fuera del rango a partir del 4 día. No tuvo consistencia fuerte a partir del 4 día.	C

Nota: N.C = no cumple con el criterio.

C: cumple con el criterio

Comparando los factores analizados para determinar el desempeño de los medios de cultivo analizados, se pudo determinar que a partir del cuarto día el medio de cultivo Sabouraud + cloranfenicol presentaba cambios que involucraban el desempeño del medio, como el pH fuera del rango óptimo y cambio en la coloración del medio; por tanto, el medio se deberá usar como máximo hasta el tercer día en condiciones de almacenamiento a una temperatura de 55°C para evitar que sus propiedades afecten su desempeño.

El medio de cultivo extracto de malta se hace necesario suplementarlo para regular su pH, de esta manera volver a evaluar su rendimiento y analizar las diferencias que se presenten en los resultados. Ya que en ningún momento presentó selectividad en el crecimiento de la cepa no target, sin embargo, fuera de lo anteriormente mencionado, a partir del cuarto día se evidenció cambios en el color, consistencia del gel y cambios en el pH fuera del rango óptimo. No obstante,

se hace necesario recurrir a realizar el ensayo varias veces para los cuatro medios de cultivo para determinar mediante un promedio, la vida útil de los medios de cultivo usados en el laboratorio para el crecimiento de mohos y levaduras.

Para el caso de los medios de cultivo DG-18 y DRBC no se encontraron cambios significativos en las propiedades microbiológicas y fisicoquímicas que comprometieran el desempeño del medio, ya que los resultados se encontraban dentro del rango establecido, sin embargo, se sugiere que el medio sea usado antes del 5 día debido a que el medio se encontraba un poco deshidratado al momento de servirlo en caja.

7. CONCLUSIONES

- Los resultados del análisis microbiológico realizado en la muestra de perro caliente indican que el alimento no es apto para el consumo humano debido a la presencia de Coliformes totales y *Bacillus cereus*. Este producto es susceptible de contaminación debido a sus componentes y es por esto que se debe llevar un control sanitario más riguroso.
- Se comprobó la esterilidad comercial de diversos alimentos envasados herméticamente estableciendo que cumplen con los requisitos de esterilización comercial a los que se sometieron.
- Se determinó que los medios de cultivo con mayor desempeño fueron el DRBC y DG-18 con una vida útil de 6 días mientras que el medio de cultivo Sabouraud mas cloranfenicol mostró un desempeño menor con una vida útil de 3 días.
- Al evaluar el desempeño de los medios de cultivo para mohos y levaduras se determinó que como el medio extracto de malta no mostró un resultado favorable desde el primer día del análisis puesto que no posee selectividad frente a los microorganismos No target, requiere una modificación en su fórmula para poder evaluar su desempeño nuevamente y de esta manera, determinar su vida útil.
- El jabón de manos analizado presenta adecuada calidad microbiológica cumpliendo con lo dispuesto en la Resolución MPS No. 2120 del 2019. Es importante que los dispensadores se encuentren en buen estado y bien cerrados para evitar posibles contaminaciones.

8. RECOMENDACIONES

- Cambiar el método de preparación del medio extracto de malta de acuerdo a lo estipulado por la casa comercial Neogen culture media, adicionando el vial para ajustar el pH a un nivel más ácido.
- Es importante realizar el procedimiento del desempeño de los medios de cultivo varias veces (mínimo dos veces más), con el fin de obtener un promedio y determinar la vida útil de éstos teniendo en cuenta el cambio de preparación del medio anteriormente mencionado.
- Emplear medios de cultivo cromogénicos para el aislamiento microbiano.
- A pesar del poco tiempo que se maneja dentro del laboratorio, es necesario realizar inducciones en metodologías poco aplicadas, de esta manera se refuerzan los conceptos, se evita caer en desarrollo netamente técnico y se evalúa los resultados esperados evitando los errores aleatorios al realizar el montaje y hacer el reporte.

9. GLOSARIO

Aseguramiento de Calidad: Conjunto de actividades planeadas y sistemáticas, que lleva a cabo una empresa, con el objeto de brindar la confianza apropiada, de que un producto o servicio cumple con los requisitos de calidad especificados.

Autoridad sanitaria competente: autoridad encargada por la ley para ejercer funciones de inspección, vigilancia y control. En Colombia la autoridad encargada es el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos INVIMA y las Direcciones Territoriales de Salud, Adoptan las acciones de prevención y seguimientos de los establecimientos públicos y privados para garantizar cumplimiento a lo dispuesto en el presente decreto ley 9 del 1979 (Congreso de Colombia, 1979), resolución 2674 de 2013 (INVIMA, 2013), decreto 780 de 2016 (Ministerio de Salud y Protección Social, 2016).

Cepa de referencia: Microorganismo obtenido directamente de una referencia de colección de cultivo, la cual pertenece y es miembro de la federación mundial de colección de cultivos (WFCC)

Cepario: Conjunto de cultivos o cepas de microorganismos viables, aislados y conservados por diferentes métodos.

Comparación interlaboratorios: evaluación de organización, realización de mediciones o diferentes ensayos sobre el mismo ítem o ítems similares dados por dos o más laboratorios de acuerdo con ciertas condiciones predeterminadas.

Contaminación cruzada: Contaminación generada cuando un proceso o un producto y/o materia prima puede ser contaminante de otro proceso, producto y/o materia prima.

Control de Calidad: Conjunto de métodos y actividades de carácter operativo, que se utilizan para satisfacer el cumplimiento de los requisitos de calidad establecidos.

Criterio de precisión: Es el grado de concordancia entre los valores obtenidos por medidas repetidas en la misma muestra o similares en condiciones determinadas de repetitividad y reproducibilidad.

Especificidad: capacidad del método para diferenciar precisa y específicamente el compuesto de interés, en presencia de los demás componentes, que se espera estén presentes en la matriz de la muestra.

Esterilización: Es la eliminación completa de toda forma de vida microbiana. Puede conseguirse a través de métodos químicos, físicos y gaseosos.

Exactitud: Se define como el grado de concordancia o como la diferencia entre la media de los resultados del ensayo obtenidos por el método y el valor verdadero o el valor aceptado como correcto para la cantidad medida. Se conoce también como error sistemático o sesgo.

Incertidumbre: es un parámetro asociado al resultado de la medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente asignados. Es una indicación cuantitativa de la calidad del resultado, da idea de la confiabilidad del resultado.

ISO: ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS. Federación mundial de normas nacionales estandarizadas.

Laboratorio: Organismo encargado de ejecutar ensayos, calibración muestreo o el valor de calibración.

Límite de cuantificación: Corresponde a la más baja cantidad del analito que puede determinarse cuantitativamente con precisión y exactitud aceptables.

Límite de detección: Es un número expresado en unidades de concentración (o cantidad) que describe el más bajo nivel de concentración de una sustancia que puede determinarse como estadísticamente diferente del blanco analítico.

Material estéril: Es aquel material libre de microorganismos patógenos, no patógenos y esporas, después de haberse sometido a un proceso de esterilización.

Medios selectivos: Son medios sólidos que eliminan el crecimiento de microorganismos indeseables y permiten el desarrollo de un microorganismo o grupo de microorganismos.

Organismo test: Microorganismo generalmente usado para el rendimiento de un test de cultivo de medio.

Precisión: Se relaciona con la dispersión de la medida alrededor de un valor medio o central y mide la concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidas veces a muestras separadas e idénticas, obtenidas del mismo lote de material homogéneo.

Revalidación: Es la repetición de un procedimiento de validación o una parte del mismo. Esto no significa que el programa original deba ser repetido. Se aplica cuando se presenta cambio de uno de los componentes críticos de la formulación, cambio o reemplazo de una pieza crítica en un sistema o equipo, cambio en instalaciones, cambio en tamaño del lote de fabricación y por unidades producidas fuera de especificaciones en lotes consecutivos.

Productividad: Recuperación o supervivencia de los microorganismos.
Selectividad: Inhibición o supresión de los microorganismos no deseados.

Sensibilidad: proporción de muestras positivas o reactivas correctamente identificadas por la prueba empleada.

Validación: requisitos que satisfacen formalmente el nivel de ejecución de un sistema, en consecuencia, se genera unos parámetros controlados frente a los resultados obtenidos.

Verificación: Aportación de evidencia objetiva de que un ítem dado satisface los requisitos especificados.

10. BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, L., Mendoza, C. & Oyón, R. (2001). Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, *Staphylococcus* spp. y hongos en ensaladas para perro calientes expendidas en la ciudad de Maracay, Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51(4), 366-370. Disponible en: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2001/4/art-7/>

Ajello, L. (1957) Cultural Methods for Human Pathogenic Fungi J. Chron. Dis. 5:545-551. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0021968157900978>

Andrade RB De, Gemelli T, Onder LPD, Cristina K, Brito T De, Brito BG De. (2010). Métodos Diagnósticos Para Os Patógenos Alimentares: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. *Arq Inst Biol. Sao Paulo*. 77(4):741-50. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/aib/a/mDG3bHnF3GtCK8cRXMBTctC/?lang=pt&format=pdf>

Bashir, A., Lambert, P. (2020). Microbiological study of used cosmetic products: highlighting possible impact on consumer health. *J Appl Microbiol*. 128(2):598-605. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31597215/>

Bayona M. (2009). Evaluación microbiológica de alimentos adquiridos en la vía pública en un sector del norte de Bogotá. Bogotá D.C. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-42262009000200002&script=sci_abstract&tlng=es

Beuchat LR, Frandberg E, Deak T, Alzamora SM, Chen J, Guerrero AS, López-Malo A, Ohlsson I, Olsen M, Peinado JM, Schnurer J, de Silloniz MI, Tornai-Lehoczki J. (2001). Performance of mycological media in enumerating desiccated food spoilage yeasts: an interlaboratory study. *Int. J. Food Microbiol*. 77:1-12. Disponible en: https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/collection/paper/document/paper_01681605_v70_n1-2_p89_Beuchat

Blanc, B., Magalhaes, M., Abdelbary, G., Prod'hom, G., Greub, J., Wasserfallen, P., Genoud, G., and Zanetti, L. Hand soap contamination by *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital: no evidence of impact on patients. *Journal of Hospital Infection*. 93(1), 63-67. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27021398/>

Bonilauri P, Bardasi L, Leonelli R, Ramini M, Luppi A, Giacometti F, et al. (2016). Detection of food hazards in foods: comparison of real time polymerase chain

reaction and cultural methods. *Ital J Food Saf.* 5(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5076710/>

Bortolussi, R. (2008). Listeriosis: una cartilla. *CMAJ: Revista de la Asociación Médica Canadiense.* 179 (8), 795–797. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2553879/>

Brooks, F., Carroll, K., Butel, J., Morse, S. y Mietzner, T. (2010). *Microbiología Médica*, Jawetz, Melnick y Adelberg. México, McGraw Hill. Disponible en: https://www.academia.edu/8712379/Microbiolog%C3%ADa_m%C3%A9dica_Jewetz_Melnick_Adelberg

Cáceres, M. (2018). Determinación de la calidad microbiológica de cosméticos capilares elaborados a base de compuestos naturales comercializados en Lima Metropolitana. Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú. Disponible en: https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/1750/Caceres_mp.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Calle, A., Carrascal, A., Patiño, C., Carpio, C., y Echeverry, A. (2021). Mindy Brashears, Seasonal effect on *Salmonella*, Shiga toxin-producing *E. coli* O157:H7 and non-O157 in the beef industry in Colombia, South America. *Heliyon* 7(7). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/unipamplona.basesdedatosezproxy.com/science/article/pii/S2405844021016509>

Campos, J. (2013). Evaluación de los medios de cultivo para verificar su reproductibilidad y selectividad. Instituto Tecnológico de Colima. Villa de Álvarez, Colima. Disponible en: <https://dspace.itcolima.edu.mx/bitstream/handle/123456789/655/MEMORIA%20DE%20RESIDENCIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Campuzano, F., Mejía, D., Madero, C. & Pabón, P. (2015). Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá D.C. *Nova*, 13(23), 81-92. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-24702015000100008&script=sci_abstract&tlng=es

Castro DA, Porras O, Bermúdez SC, Velasco NJ, Osorio LM. (2016). Detección de *Listeria* spp y *Salmonella* spp en queso y su relación con las características fisicoquímicas. *Politécnica.* 12(23):91-98. Disponible en: https://revistas.elpoli.edu.co/index.php/pol/user/setLocale/pt_BR?source=%2Findex.php%2Fpol%2Farticle%2Fview%2F903%2F0

Conrad, C., Gilroyed, B., McAllister, T., y Reuter, T. (2012). Synthesis of O-serogroup specific positive controls and real-time PCR standards for nine clinically relevant non-O157 STECs. *Journal of Microbiological Methods*. 91(1), 52-56. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22828126/>

European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA) (1997). Guidelines on Microbial Quality Management. Disponible en: https://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/industria_cosmetica.pdf

Colmenares, M., Correia de Soto, A. & De Sousa, C. (2008). Evaluación de la calidad fisicoquímica y bacteriológica en piscinas del estado Carabobo, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* 48: 73-82. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482008000100008

Craun, G.F., Brunkard, J.M., Yoder, J.S., Roberts, V. A., Carpenter J., Wade, T., Roy, S.L. (2010). Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. *J Clin Microbiol.* 23 (3), 507-528. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20610821/>

Decreto 219 (1998). Ministerio de Salud. Bogotá, D. C. Disponible en: https://www.invima.gov.co/documents/20143/448427/decreto_219_1998.pdf/9fac6f26-bc66-126f-e5b9-ae0af0b94f76

Decreto 1575 (2007). Ministerio de la Protección Social. Bogotá, D. C. Disponible en: <https://www.minambiente.gov.co/images/GestionIntegraldelRecursoHidrico/pdf/Disponibilidad-del-recurso-hidrico/Decreto-1575-de-2007.pdf>

Delgado, L. y Maurtua, D. (2003). Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. *Rev Panam Salud Pública.* 14(3):158-164. Disponible en: <https://www.scielosp.org/article/rpsp/2003.v14n3/158-164/>

Díaz, C. y González, B. (2001). *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. *RESPYN.* 2(3):1-8. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=23155>

Elder, R., Keen, J., Siragusa, G., Gallagher, G., Koohmaraie, M., y Laegreid, W. (2000). Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences Mar* 97 (7) 2999-3003. Disponible en: <https://www.pnas.org/content/97/7/2999>

Engel, G. (1982). Vergleich verschieden Nährböden zum quantitativen Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen in Milch und Milchprodukten. *Milchwiss.* 37: 727-730. Disponible en:

https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10007/ncm0187_ts_en-us.pdf

Evans, E., Samuel, E., Redmond, E. y Taylor, H. (2021). Exploring *Listeria monocytogenes* perceptions in small and medium sized food manufacturers: Technical leaders' perceptions of risk, control and responsibility. *Food Control*. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/unipamplona.basesdedatosezproxy.com/science/article/pii/S0956713521002164>

64

INSULAB. (2021). Equipos de Control y Detección de Patógenos y Microorganismos por PCR. (s.f). Disponible en: <https://www.insulab.es/deteccion-patogenos-pcr/>

Galli, A., Katsunori, I., Halle, M., & Bilali, H., Grunewald, N., Eaton, D., Capone, R., Debs, P., & Bottalico, F. (2016). Mediterranean countries food consumption and sourcing patterns: An Ecological Footprint viewpoint. *Science of the Total Environment*. 578. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/309858462_Mediterranean_countries'_food_consumption_and_sourcing_patterns_An_Ecological_Footprint_viewpoint

Galloway, L.D. and Burgess, R. (1952). *Applied Mycology and Bacteriology*. London. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jctb.5000582212>

Geiser, D. (2008). Sexual structures in *Aspergillus*: Morphology, importance and genomics. *Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology*. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/5243848_Sexual_structures_in_AspERGILLUS_Morphology_importance_and_genomics

Helms, M., Simonsen, J., Molbak, K. (2006). Foodborne bacterial infection and hospitalization. *ClinInfectDis.* 42: 498-506. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16421794/>

Hernández, M., Hansen, F., Cook, N., y Rodríguez, D. (2009). Métodos de PCR en tiempo real para la detección de patógenos bacterianos transmitidos por alimentos en carnes y productos cárnicos. *Seguridad de la carne y la carne procesada*: p. 427–46. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/19577111.pdf>

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2000). NTC-ISO 4772. Calidad del Agua. Detección y recuento de *E. coli* y Bacterias coliformes parte I. Bogotá D.C. Disponible en: <https://www.icontec.org/rules/calidad-del-agua-deteccion-y-recuento-de-escherichia-coli-y-de-bacterias-coliformes-parte-1-metodo-de-filtracion-por-membrana/>

Instituto Nacional de Salud. (2020). Situación de la Enfermedad diarreica aguda en Colombia. Boletín epidemiológico semanal. Disponible en: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020 Boletin epidemiologico semana 20.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2020.pdf)

ISO 6888-1: 1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Disponible en: <https://www.iso.org/standard/23036.html>

ISO 7932: 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/38219.html>

ISO 21527-1:2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs— Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds. Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0.95. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/38275.html>

ISO 11133:2014+A1:2018 Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media. Disponible en: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0060657>

Kornacki J & Johnson J. (2001) “Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators”. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 69-82. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/300755932_Enterobacteriaceae_Coliforms_and_Escherichia_coli_as_Quality_and_Safety_Indicators

Kotsyurbenko, OR, Chin, K.-J., Glagolev, MV, Stubner, S., Simankova, MV, Nozhevnikova, AN, et al. (2004). Producción de metano acetoclástico e hidrogenotrófico y poblaciones metanogénicas en una turbera ácida de Siberia Occidental. *Reinar. Microbiol.* 6, 1159-1173. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15479249/>

King Jr, A.D., Hocking, A.D. and Pitt, J.I. (1979). Dichloran-Rose Bengal Medium for Enumeration and Isolation of Molds from Foods. *J. Appl. Environ. Microbiol.*

1979, 37, 959-964. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243332/>

Latorre, N. (2007). Evaluación de medios de cultivo altos y bajos en nutrientes para la recuperación de heterótrofos edáficos en la Ecoregión cafetera de los Andes. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D. C. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8217>

Lauber, CL, Hamady, M., Knight, R. y Fierer, N. (2009). Evaluación basada en pirosecuenciación del pH del suelo como predictor de la estructura de la comunidad bacteriana del suelo a escala continental. *Apl. Reinar. Microbiol.* 75, 5111–5120. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.00335-09>

Mamani, S. (2016). Tiempo de vida útil de medios de cultivo. Universidad Mayor de San Andres. La Paz Bolivia. Disponible en: <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/11994>

Merck. (2010). *Microbiology Manual*. (12 ed). Madrid, España: Elsevier.

Moraes PM, Viçosa GN, Yamazi AK, Ortolani MBT, Nero LA. (2009). Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. *Foodborne Pathog Dis.* 6(2):245-249. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19099356/>

NCCLS Document (1990). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 4th ed. 10:7, p 10. Disponible en: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=58139aa4615e27240754da03&assetKey=AS%3A422233756704774%401477679780485>

Olsen, E., Sorokulova, I., Petrenko, V., Chen, I., Barbaree, J., y Vodyanoy, V. (2006). Affinity-selected filamentous bacteriophage as a probe for acoustic wave biodetectors of *Salmonella typhimurium*. *Biosens Bioelectron.* 21(8):1434-42. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16085408/>

Organización Mundial de la Salud. (2006). Guías para la calidad del Agua Potable. Disponible en: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwg/gdwq3_es_full_lowres.pdf

Organización Panamericana de la Salud. (2002). Desinfección del agua. Manual OPS/CEPIS/PUB.2. 83: 33-38. Disponible en: https://sswm.info/sites/default/files/reference_attachments/SOLSONA%20y%20MENEZ%202002.%20Desinfecci%C3%B3n%20del%20agua.pdf

Oyekunle, J., Ore, O., Ogunjumelo, O., and Akanni, M. (2021). Comparative chemical analysis of Indigenous Nigerian soaps with conventional ones.

Heliyon. 7 (4). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844021007921>

Pal, M. & Ayele, Y. (2019). Public health significance of verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7. 11. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/337673840_Public_health_significance_of_verotoxin_producing_Escherichia_coli_O157_H7

Peña, M., Dávila, C., Tresierra, Á., y Castro, J. (2014). Identificación molecular de *Escherichia coli* enterotoxigénica en niños con infecciones diarreicas agudas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Cienc Amaz.* 4(2):117-22. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/309147137_Identificacion_molecular_de_Escherichia_coli_enterotoxigenica_en_ninos_con_infecciones_diarreicas_agudas_mediante_la_Reaccion_en_Cadena_de_la_Polimerasa

Petro, A. y Wees, T. (2013). Evaluación de la calidad fisicoquímica y microbiológica del agua del municipio de Turbaco Bolívar, Caribe Colombiano. Cartagena de Indias: Universidad Tecnológica de Bolívar. Disponible en: <https://biblioteca.utb.edu.co/notas/tesis/0067155.pdf>

Pexara A, Solomakos N, Sergelidis D, Govaris A. (2012). Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in Feta and Galotyri cheeses. *J Dairy Res.* 79(4):405-413. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22849852/>

Prasad, D., y Sharan, A. (2009). DNA based methods used for characterization and detection of food borne bacterial pathogens with special consideration to recent rapid methods. *Afr J Biotechnol.* 8(9):1768-75. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/254201745_DNA_based_methods_used_for_characterization_and_detection_of_food_borne_bacterial_pathogens_with_special_consideration_to_recent_rapid_methods

Raftari, M., Jalilian, F. A., Abdulmir, A. S., Son, R., Sekawi, Z., & Fatimah, A. B. (2009). Effect of organic acids on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* contaminated meat. *The open microbiology journal*, 3, 121–127. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2729390/>

Reece, J. y Campbell, N. (2011). *Biología Campbell*. Panamericana. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=QcU0yde9PtkC&printsec=copyright>

Resolución N° 002511 (1995). Ministerio de Salud. Bogotá, D. C. Disponible en: https://www.invima.gov.co/documents/20143/448427/resolucion_002511_1995.pdf/6642d758-2bd2-6c88-c273-78f833981221

Resolución N° 02800 (1998). Ministerio de Salud. Bogotá, D. C. Disponible en: https://www.invima.gov.co/documents/20143/448427/resolucion_02800_1998.pdf/a86c5d4a-d720-1620-b516-311a49cb51c0

Resolución N° 3773 (2004). Ministerio de la Protección Social. Bogotá, D. C. Disponible en: https://www.redjurista.com/Documents/resolucion_3773_de_2004_ministerio_de_la_proteccion_social.aspx

Resolución N° 003774 (2004). Ministerio de la Protección Social. Bogotá, D. C. Disponible en: https://www.invima.gov.co/documents/20143/449018/RESOLUCION_No_003774_de_2004.pdf

Resolución N° 2115 (2007). Ministerio de la Protección Social. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Bogotá, D. C. Disponible en: https://www.minambiente.gov.co/images/GestionIntegraldelRecursoHidrico/pdf/normativa/Res_2115_de_2007.pdf

Resolución N° 1229 (2013). Ministerio de Salud. Ministerio de la Protección Social. Bogotá, D. C. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-1229-de-2013.pdf>

Resolución N° 2674 (2013). Ministerio de Salud. Ministerio de la Protección Social. Bogotá, D. C. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-2674-de-2013.pdf>

Resolución N° 2120 (2019). Secretaría General de la Comunidad Andina. Bogotá, D. C. Disponible en: https://www.invima.gov.co/documents/20143/448427/Resolucion_microbiologia_2120.pdf

Rodríguez, M. (2012). Revisión bibliográfica de la normatividad y legislación vigente en aspectos de calidad microbiológica para la industria cosmética en Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8925/tesis856.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Romeu, B., Salazar, P., Navarro, A., Lugo, D., Hernández, U., Rojas, N., y Eslava, C. (2010). Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 41:1-9. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181220509037.pdf>

Thompson, LR, Sanders, JG, McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, KJ y col. (2017). Un catálogo común revela la diversidad microbiana multiescala de la Tierra. *Nature* 551, 457. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature24621>

UNICEF (2020). Cada día mueren 1.800 niños por enfermedades diarreicas relacionadas con la falta de agua, saneamiento e higiene. España. Recuperado de: <https://www.unicef.es/prensa/cada-dia-mueren-1800-ninos-por-enfermedades-diarreicas-relacionadas-con-la-falta-de-agua>

Tong, S., Ma, L., Ronholm, J., Hsiao, W., y Lu, X. (2021). Whole genome sequencing of *Campylobacter* in agri-food surveillance. *Current Opinion in Food Science*, 39:130-139. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/unipamplona.basesdedatosezproxy.com/science/article/pii/S221479932100047>

Valcárcel, L. (2014). Aplicación de métodos moleculares a la detección y tipificación de patógenos alimentarios en alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/40286/TFG%20LAURA%20VALCARCEL%20HERVAS.pdf?sequence=1>

Venkateswaran, K., Y. Kamijoh, E. Ohashi and H. Nakanishi. (1997). A simple filtration technique to detect Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and its toxins in beef by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4127-4131. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9327582/>

Warriner, K. & Namvar, A. (2009). What is the hysteria with *Listeria*?. Trends in Food Science & Technology. *Trends Food Sci Technol.* 20. 245-254. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/248485594_What_is_the_hysteria_with_Listeria

Yáñez, E., Máttar, S., y Durango, A. (2008). Determinación de *Salmonella* spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. *Asoc Colomb Infectología.* (4):246-54. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n4/v12n4a03.pdf>

11. ANEXOS

ANEXO A. Ficha técnica del medio de cultivo DG-18

Technical Specification Sheet



Dichloran Glycerol (DG-18) Agar Base (NCM0081)

Intended Use
Dichloran Glycerol (DG-18) Agar Base is used for the selective isolation and enumeration of yeasts and molds from foods in a laboratory setting. Dichloran Glycerol (DG-18) Agar Base is not intended for use in the diagnosis of disease or other conditions in humans.

Description
Dichloran Glycerol (DG-18) Agar Base is used for the enumeration of viable osmophilic yeasts and xerophilic molds in food or animal feed products with a water activity of less than or equal to 0.95. This includes such foods as dry fruits, jams, cakes, dried meat, salted fish, grains, cereals, flours, nuts, spices, condiments and some animal feeds. This medium is not suitable for the examination of dehydrated products with a water activity of greater than 0.95. Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (NCM0082 or NCM0029) should be used.

The reduction in water activity in this medium is achieved by the addition of glycerol at approximately 18% and this is very important as many yeast and molds require a low water activity to enhance growth and colony development. The medium also contains the antifungal agent dichloran, which restricts the spreading of mucoraceous fungi and restricts the colony size of other genera making colony counting an easier task.

Additional selectivity against bacterial growth is achieved by the incorporation of the heat-stable antibiotic Chloramphenicol. Glucose is incorporated as the fermentable carbohydrate source, with casein enzymatic digest providing the essential vitamins, minerals, amino acids, nitrogen and carbon.

Typical Formulation

Casein Enzymatic Digest	5.0 g/L
D-Glucose	10.0 g/L
Potassium Dihydrogen Phosphate	1.0 g/L
Magnesium Sulfate	0.5 g/L
Dichloran	0.002 g/L
Chloramphenicol	0.1 g/L
Agar	15.0 g/L

pH: 5.6 ± 0.2 at 25°C
Formula may be adjusted and/or supplemented as required to meet performance specifications.

Precaution
Refer to SDS

Preparation

1. Suspend 31.6 g of medium and 220 grams of glycerol in one liter of purified water.
2. Heat with frequent agitation and boil for one minute to completely dissolve the medium.
3. Autoclave at 121°C for 15 minutes.
4. DO NOT OVERHEAT
5. Cool to 45-50°C.

Test Procedure
Developed with reference to ISO 21527-2:2008 and is tested to the performance requirements of this standard.



620 Leshar Place • Lansing, MI 48912
800-234-5333 (USA/Canada) • 517-372-9200
foodsafety@neogen.com • foodsafety.neogen.com

Effective Date: 11/21/2018

Revision: 0

Technical Specification Sheet



Quality Control Specifications

Dehydrated Appearance: Powder is homogeneous, free flowing, and beige.

Prepared Appearance: Prepared medium is clear to slightly hazy and beige.

Expected Cultural Response: Cultural response on Dichloran Glycerol (DG-18) Agar Base at 25 ± 1°C for up to 5 days of incubation.

<u>MICROORGANISM</u>	<u>ATCC</u>	<u>APPROX. INOCULUM (CFU)</u>	<u>EXPECTED RESULTS</u>
<i>Aspergillus restrictus</i>	42693	Point Inoculation	Growth
<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>	6633	>10 ⁴	Inhibited
<i>Candida albicans</i>	10231	50-200	>50% Recovery
<i>Escherichia coli</i>	25922	>10 ⁴	Inhibited
<i>Penicillium roquefortii</i>	10110	Point Inoculation	Growth
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763	50-200	>50% Recovery
<i>Wallemia sebi</i>	42694	Point Inoculation	Growth
<i>Eurotium rubrum</i>	42690	Point Inoculation	Growth

The organisms listed are the minimum that should be used for quality control testing.

Results

Observe and record number of yeasts and/or molds present. Report as appropriate per/sample being tested.

Expiration

Refer to expiration date stamped on the container. The dehydrated medium should be discarded if not free flowing, or if appearance has changed from the original color. Expiry applies to medium in its intact container when stored as directed.

Limitations of the Procedure

1. Complete classification of yeast and molds is dependent upon microscopic observations of direct and/or slide culture preparations, along with biochemical and serological tests.
2. Due to nutritional variation, some strains may be encountered that grow poorly or fail to grow on this medium.

Storage

Store dehydrated culture media at 2-30°C away from direct sunlight. Once opened and recapped, place container in a low humidity environment at the same storage temperature. Protect from moisture and light by keeping container tightly closed.

References

1. Bell, C., Neaves, P., Williams, A.P. (2005). Food microbiology and laboratory practice. Blackwell, Oxford. p324.
2. Beuchat, L.R. Media for detecting and enumerating yeasts and moulds. In Corry, J.E.L., Curtis, GDW., Baird, R.M., Editors. Handbook of Culture Media for Food Microbiology, p369-386.
3. Beuchat LR, Frandberg E, Deak T, Alzamora SM, Chen J, Guerrero AS, López-Malo A, Ohlsson I, Olsen M, Peinado JM, Schnurer J, de Sílvez MI, Tornai-Lehoczki J. (2001). Performance of mycological media in enumerating desiccated food spoilage yeasts: an interlaboratory study. *Int.*



620 Leshar Place • Lansing, MI 48912
800-234-5333 (USA/Canada) • 517-372-9200
foodsafety@neogen.com • foodsafety.neogen.com

Effective Date: 11/21/2018

Revision: 0

ANEXO B. Ficha técnica del medio DRBC

Technical Specification Sheet



DRBC Agar (ISO) (NCM0082)

Intended Use

Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar (ISO) is for the enumeration of viable yeasts and molds in products intended for human consumption or as animal feed as described in ISO 21527-1:2008. DRBC Agar (ISO) is not intended for use in the diagnosis of disease or other conditions in humans.

Description

A selective agar for the enumeration of viable yeasts and molds in products intended for human consumption or as animal feed that have a water activity greater than 0.95. Enumeration is by means of the colony count technique at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, as described in ISO 21527-1:2008. DRBC Agar (ISO) is based on the formula described by King *et al.* and developed with reference to ISO 21527-1:2008 for the enumeration of yeasts and molds in food and animal products. The medium is used for the enumeration of viable yeasts and molds in products with a water activity of greater than 0.95 such as eggs, meat, some dairy products, fresh pastes, fruit and vegetables. DRBC Agar is designed to suppress the colonial growth of 'spreader' molds and in doing so allow easier performance of the colony count technique on yeasts and molds.

The use of the anti-fungal agent, Dichloran, restricts spreading of mucoraceous fungi and restricts the colony size of other genera. Rose Bengal also assists in the reduction of colony sizes and is selective against bacteria. Additional selectivity against bacterial growth is achieved through both the low pH of the medium and the incorporation of the heat-stable antibiotic Chloramphenicol. Glucose is incorporated as the fermentable carbohydrate source, an enzymatic digest of animal & plant tissues providing the essential vitamins, minerals, amino acids, nitrogen and carbon, and sodium chloride providing an osmotic balance. According to ISO 21527-1:2008 the test portion and the diluted test portion are inoculated onto DRBC Agar plates. This medium conforms to the performance and formulation requirements of ISO 21527-1:2008.

Typical Formulation

Enzymatic Digest of Animal & Plant Tissue	5.0 g/L
D-Glucose	10.0 g/L
Potassium Dihydrogen Phosphate	1.0 g/L
Magnesium Sulphate	0.5 g/L
Dichloran	0.002 g/L
Chloramphenicol	0.1 g/L
Rose Bengal	0.025 g/L
Agar	15.0 g/L

Final pH: 5.6 ± 0.2 at 25°C

Formula may be adjusted and/or supplemented as required to meet performance specifications.

Precaution

Refer to SDS

Preparation

1. Suspend 31.7 grams of medium in one liter of purified water.
2. Heat with frequent agitation and boil for one minute to completely dissolve the medium.
3. Autoclave at 121°C for 15 minutes.
4. Cool to $45\text{--}50^\circ\text{C}$.
5. Use immediately, or store in the dark according to ISO 11133 until required



620 Leshar Place • Lansing, MI 48912
800-234-5333 (USA/Canada) • 517-372-9200
foodsafety@neogen.com • foodsafety.neogen.com

Technical Specification Sheet



Test Procedure

For the enumeration of yeasts and molds- Refer to ISO 21527-1:2008

Quality Control Specifications

Dehydrated Appearance: Powder is homogenous, free flowing, and pink.

Prepared Appearance: Prepared medium is pink, clear to slightly hazy.

Expected Cultural Response: Cultural response at 25 ± 1°C after 5 days incubation.

Microorganism	Approx. Inoculum (CFU)	Expected Results
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> WDCM 00058	50-200	≥50%*
<i>Aspergillus brasiliensis</i> WDCM 00053	50-200	≥50%*
<i>Candida albicans</i> WDCM 00054	50-200	≥50%*
<i>Mucor racemosus</i> WDCM 00181	50-200	≥50%*
<i>Escherichia coli</i> WDCM 00012	>10 ⁴	Total inhibition
<i>Escherichia coli</i> WDCM 00013	>10 ⁴	Total inhibition
<i>Bacillus subtilis</i> WDCM 00003	>10 ⁴	Total inhibition

* Characteristic colonies/propagules according to each species

The organisms listed are the minimum that should be used for quality control testing.

Results

Fermentation of the carbohydrate source glucose supports the growth of yeasts and molds. The anti-fungal agents Dichloran and Rose Bengal inhibit spreading molds and restrict colony size, to improve enumeration and detection.

Additional selectivity is achieved by the Chloramphenicol, which allows inhibition of bacterial growth.

Expiration

The dehydrated medium should be discarded if it is not free flowing, or if the appearance has changed from the original color. Expiry applies to medium in its intact container when stored as directed

Limitations of the Procedures

Due to nutritional variation, some strains may be encountered that grow poorly or fail to grow on this medium.

Storage

Store dehydrated culture media (NCM0082) at 2-30°C away from direct sunlight. Once opened and recapped, place container in a low humidity environment at the same storage temperature. Protect from moisture and light by keeping container tightly closed.

Revision: 2 Effective Date: 1/26/2021

ANEXO C. Ficha técnica del medio extracto de malta

Technical Specification Sheet



Malt Extract Agar (NCM0093)

Intended Use

Malt Extract Agar is used for the cultivation of fungi and is not intended for use in the diagnosis of disease or other conditions in humans.

Description

An acidic medium which will support the growth of most yeasts and molds whilst inhibiting most bacteria. It was first described by Thom and Church in 1926 in a study of *Aspergillus* spp. claiming the high carbohydrate content ensured rapid growth. Selectivity can be increased by further lowering the pH with the addition, after sterilization, of Lactic Acid (X037). It should be noted that excess heating of this medium together with its low pH can easily result in hydrolysis of the agar gel producing soft plates.

Typical Formulation

Malt Extract 30.0 g/L
Peptone 5.0 g/L
Agar 15.0 g/L

pH: 5.4 ± 0.2 at 25°C

Formula may be adjusted and/or supplemented as required to meet performance specifications.

Precaution

1. Refer to SDS

Preparation

1. Suspend 50 grams of the medium in one liter of purified water.
2. Heat with frequent agitation to boiling to completely dissolve the medium.
3. Autoclave at 121°C for 15 minutes.
4. Cool to 45-50°C
5. If the addition Lactic Acid (X037) is required, this should be done after sterilization.
6. One 5mL vial of X037 will lower the pH of 250mL of medium to 3.5-4.0.

Test Procedure

Consult appropriate references for recommended test procedures.

Quality Control Specifications

Dehydrated Appearance: Powder is homogeneous, free flowing, and beige to tan.

Prepared Appearance: Prepared medium is clear to slightly hazy, no precipitate and beige to pale tan.

Expected Cultural Response: Cultural response on Malt Agar incubated at appropriate atmosphere and temperature and examined for growth after 48 – 120 hours.

Microorganism	Approx. Inoculum (CFU)	Expected Results
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC® 16404	50-200	>50%
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231	50-200	>50%
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC® 6633	4 Quad Streak	Good Growth

The organism listed is the minimum that should be used for quality control testing.

Results

Refer to appropriate references and procedures for results.



620 Leshar Place • Lansing, MI 48912
800-234-5333 (USA/Canada) • 517-372-9200
foodsafety@neogen.com • foodsafety.neogen.com

Effective Date: 9/14/2018

Revision: 0

Technical Specification Sheet



Expiration

Refer to expiration date stamped on the container. The dehydrated medium should be discarded if not free flowing, or if appearance has changed from the original color. Expiry applies to medium in its intact container when stored as directed.

Limitations of the Procedure

1. Due to nutritional variation, some strains may be encountered that grow poorly or fail to grow on this medium.
2. Do not heat the medium after addition of acid. The agar will hydrolyze, reducing the agar's solidifying properties.

Storage

Store dehydrated culture media at 2 – 30°C away from direct sunlight. Once opened and recapped, place the container in a low humidity environment at the same storage temperature. Protect from moisture and light by keeping container tightly closed.

References

1. Galloway, L.D. and Burgess, R. (1952). Applied Mycology and Bacteriology, Leonard Hill, London.
Thom and Church, 1926. The Aspergilli.

Effective Date: 9/14/2018

Revision: 0



620 Leshar Place • Lansing, MI 48912
800-234-5333 (USA/Canada) • 517-372-9200
foodsafety@neogen.com • foodsafety.neogen.com

ANEXO D. Ficha técnica del medio extracto de levadura dextrosa cloranfenicol

Technical Specification Sheet		
Yeast Extract Dextrose Chloramphenicol Agar (NCM0187)		
Intended Use Yeast Extract Dextrose Chloramphenicol Agar is a selective medium for the enumeration of yeasts and molds in milk and other dairy products, and is not intended for use in the diagnosis of disease or other conditions in humans.		
Description The medium is said to have superior storage properties to O.G.Y.E. and also has the advantage of incorporating an autoclavable supplement.		
Typical Formulation		
Yeast Extract	5.0 g/L	
Dextrose	20.0 g/L	
Agar	15.0 g/L	
Final pH: 6.6 ± 0.2 at 25°C Formula may be adjusted and/or supplemented as required to meet performance specifications.		
Supplement X009 Chloramphenicol Supplement – 1 vial per 500mL X209 Chloramphenicol Supplement – 1 vial per 1 liter		
Precaution Refer to SDS		
Preparation <ol style="list-style-type: none">1. Suspend 40 grams of the medium in one liter of purified water.2. Heat with frequent agitation and boil for one minute to completely dissolve the medium.3. Add 2 vials of X009 (X209) which have been dissolved in ethanol and autoclave at 121°C for 10 minutes.4. Allow to cool to 45-50°C before using with poured plate technique. THIS MEDIUM MUST NOT BE RE-AUTOCCLAVED.		
Test Procedure Incubate at 25°C for 5 days, aerobically. Follow the pour plate technique.		
Quality Control Specifications Dehydrated Appearance: Pale yellow, clear.		
Minimum QC: <i>Aspergillus</i> spp WDCM 00053 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> WDCM 00058 <i>Escherichia coli</i> (inhibition) WDCM 00013		
Results Count all colonies.		
		620 Leshar Place • Lansing, MI 48912 800-234-5333 (USA/Canada) • 517-372-9200 foodsafety@neogen.com • foodsafety.neogen.com

Effective Date: 4/30/2019

Revision: 0

Technical Specification Sheet



Expiration

Refer to expiration date stamped on the container. The dehydrated medium should be discarded if not free flowing or appearance has changed from the original color. Expiry applies to medium in its intact container when stored as directed.

Limitations of the Procedures

Due to nutritional variation, some strains may be encountered that grow poorly or fail to grow on this medium.

Storage

Store dehydrated culture media at 2-30°C away from direct sunlight. Once opened and recapped, place container in a low humidity environment at the same storage temperature. Protect from moisture and light by keeping container tightly closed.

References

1. Engel, G. (1982). Vergleich verschieden Nährböden zum quantitativen Nachweis von Hefen und Schimmelpilzen in Milch und Milchprodukten. *Milchwiss.* 37: 727-730.
2. International Organisation for Standardization (ISO): Milk and milk products – enumeration of yeasts and moulds – colony count technique at 25°C – standard method ISO/DIS 6611.
3. International Milchwirtschaftsverband: Milch und Milchprodukten – Zählung von Hefen und Schimmelpilzen (Kolonieählung bei 25 C). – International IMV Standard 94: (1980) in *Milchwiss.* 36: 220-222.
4. Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaft. Produkte in DIN Deutsches Institut für Normung e.V. Mikrobiologische Milchuntersuchung. Bestimmung der Anzahl von Hefen und Schimmelpilzen. Reference method DIN 10186.
5. British Standards Institute. B.S. 4285. Section 3.6: (1986).

Effective Date: 4/30/2019

Revision: 0



620 Lester Place • Lansing, MI 48912
800-234-5333 (USA/Canada) • 517-372-9200
foodsafety@neogen.com • foodsafety.neogen.com

ANEXO E. Ficha técnica del medio Sabouraud cloranfenicol

	Referencia: 064-PR0037	Scharlau Microbiología - Ficha Técnica	
	Producto: Sabouraud Chloramphenicol Agar		
Especificación			
Recuento de Mohos y levaduras, en superficies.			
Presentación			
24 Placas contacto/lrd. Placas de contacto - Triple Envase con: 15 ± 2 ml	Encajado 1 caja con 24 placas de contacto , empaquetadas en 4 blisters (base de aluminio, PVDC y doble embolsado) . Cada paquete contiene indicador de irradiación (8-14kGy) .	Caducidad 5 meses	Almacenamiento 2-25 °C
Composición			
Composición (g/):			
D(+)-Glucosa.....	40,00		
Peptona de caseína	5,00		
Peptona de carne.....	5,00		
Agar.....	15,00		
Cloranfenicol.....	0,05		
Descripción/Técnica			
<u>Descripción:</u>			
Este medio de cultivo consiste en el clásico agar de Sabouraud al que se le ha añadido el cloranfenicol, antibiótico termoestable de amplio espectro antibacteriano, para permitir un aislamiento selectivo de hongos en muestras varias, especialmente contaminadas por bacterias.			
<u>Técnica:</u>			
Las placas de contacto se utilizan en el control microbiológico de desinfección y limpieza de superficies como un tampón que actúa simultáneamente de muestreador y medio de cultivo a incubar sin otras operaciones intermedias.			
Las placas ya tienen una forma adecuada a esos usos y se pueden utilizar con distintos medios de cultivo en función del tipo microbiano que se desee controlar. Como término medio las placas de contacto ofrecen una superficie de contacto aproximada de 25 cm ² .			
En el momento de usarla, se saca la cubierta y se apoya suavemente el medio de cultivo sobre la superficie a controlar, ejerciendo una presión suave para asegurar el contacto de las dos superficies. Se retira la placa y se cubre con la tapa para evitar contaminaciones aéreas. Es aconsejable que la tapa se asegure con cinta adhesiva y que se rotule la parte inferior con los datos del muestreo (Lugar, fecha y hora). Si las superficies a muestrear son rugosas, las placas no harán buen contacto, aún cuando se aumente la presión. En estos casos es aconsejable delimitar un cuadrado de 5 cm de lado y frotarlo enérgicamente con un hisopo estéril húmedo y luego frotar el hisopo sobre la placa.			
Si se verifica la eficacia de un proceso de limpieza o desinfección, las placas deben usarse en las dos horas siguientes a la finalización del proceso, asegurándose que la superficie a muestrear esté seca. Es aconsejable incluir siempre controles positivos, muestreando la zona antes de la desinfección o zonas sucias anexas a las desinfectadas.			
La frecuencia del muestreo y de la desinfección los establecerá el técnico en función de los objetivos. De forma general se establece, aplicar directamente sobre la superficie que se quiere monitorizar, con una presión constante durante un tiempo aprox. de 10 segundos.			
Las placas inoculadas se incuban a 32-35°C durante 24-48 horas con exámenes diarios. Si se han usado medios para hongos, la incubación será a 22-25°C durante 5 días con exámenes diarios.			
Nota: Las placas de contacto se utilizan para el control de la contaminación microbiológica de las superficies y el aire en el interior de salas limpias, aisladores, RABS, industrias alimentarias y hospitales. La envoltura irradiado doble / triple asegura que el paquete en sí no contamina el medio ambiente, se retira la primera envoltura justo antes de entrar en el área limpia.			



Referencia: 064-PR0037

Scharlau Microbiología - Ficha Técnica

Producto: Sabouraud Chloramphenicol Agar

Control de Calidad

Control Físico/Químico

Color : amarillo pajizo pH: 5,6 ± 0,2 a 25°C

Control de Fertilidad

Control fertilidad según métodos y monografías armonizados en farmacopeas e ISO 11133:2014/A1:2018

Inocular: rango práctico 100 ± 20 UFC; Min. 50 UFC (Productividad) /10⁴-10⁶ (Selectividad)

Aerobiosis. Incubación a 22.5 °C ± 2.5. Lectura a las 24-72 horas para bacterias y a los 3-5 días para hongos y levaduras.

Microorganismo	Desarrollo
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC® 16404, WDCM 00053	Bueno (≥ 50%)
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231, WDCM 00054	Bueno (≥ 50%)
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 8739, WDCM 00012	Inhibido
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC® 6633, WDCM 00003	Inhibido
<i>S. cerevisiae</i> ATCC® 9763, WDCM 00058	Bueno (≥ 50%)

Control de Esterilidad

Incubación 48 horas a 30-35 °C y 48 horas a 20-25 °C: SIN CRECIMIENTO

Verificación a 7 días tras incubación en las mismas condiciones.

Bibliografía

- AJELLO, L. (1957) Cultural Methods for Human Pathogenic Fungi J. Chron. Dis. 5:545-551.
- COLIPA (1997) Guidelines on Microbial Quality Management (MQM). Brussels.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.0 (2020) 10th ed. § 2.6.13. Microbiological examination of non-sterile products: Test for specified microorganisms. Harmonised Method. EDQM. Council of Europe. Strasbourg.
- GEORGE, L.K., AJELLO, L. & PAPAGEORGE, C. (1954) Use of Cycloheximide in the Selective Isolation of Fungi Pathogenic to Man. J. Lab. Clin. Med, 44 (422-428).
- HANTSCHKE, D. (1968) Mykosen, 11, (769-778).
- ISO 11133:2014/ Adm 1:2018. Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- ISO 16212 Standard (2017) Cosmetics - Microbiology - Enumeration of yeast and mould.
- PAGANO, J. LEVIN, J.D. and TREJO, W. (1957-58) Diagnostic Medium for Differentiation of Species of Candida. Antibiotics Annual, 137-143.
- SABOURAUD, R. (1910) Les Teignes. Masson, Paris.
- USP 33 - NF 28 (2011) <62> Microbiological examination of non-sterile products: Test for specified microorganisms. Harmonised Method. USP Corp. Inc. Rockville. MD. USA.

ANEXO F. Propiedades físico químicas de los medios de cultivo evaluados para la estandarización.

Medio de cultivo	Apariencia teórica	Apariencia	Color teórico	Color	Estabilidad teórica del gel	Estabilidad del gel	pH teórico	pH experimental	Temperatura teórica	Temperatura	Tiempo
DRBC	Ligeramente turbio	C	Rosa brillante	C	Buena	C	5.6 ± 0.2	5.64	25-30 °C	27 °C	2 – 7 días
DG18	Ligeramente brumoso	C	Beige	C	Buena	C	5.6 ± 0.2	5.61	25 °C	25.31 °C	7 días
Extracto de malta	De claro a brillante con o sin precipitado	C	Beige claro a oscuro	C	Buena	C	5.4 ± 0.2	5.34	30 °C	28 °C	48 – 120 horas
Sabouraud + Cloranfenicol	Ligeramente clara a ligeramente turbia	C	Beige claro a ámbar	C	Buena	C	5.6 ± 0.2	5.53	25-30 °C	25.27 °C	2-7 días

Dónde:

C: característico

De acuerdo a la tabla las propiedades se mantienen de forma característica y dentro de los rangos teóricos, por lo tanto, tanto los resultados microbiológicos como lo fisicoquímicos evidenciar que los medios a usar se encuentran en óptimas condiciones.

ANEXO G. Propiedades físico químicas de los medios de cultivo, primer día.

Medio de cultivo	Apariencia teórica	Apariencia	Color teórico	Color	Estabilidad teórica del agar	Estabilidad del gel	pH teórico	pH Experimental	Temperatura teórica (°C)	Temperatura (°C)	Tiempo
DRBC	Ligeramente turbio	C	Rosa brillante	C	Buena	C	5,6 ±0,2	5,74	25-30	27	2-7 días
DG - 18	Ligeramente brumoso	C	Beige	C	Buena	C	5,6 ±0,2	5,56	25	25,31	7 días
Extracto de malta	De claro a brillante con o sin precipitado	C	Beige claro a oscuro	C	Buena	C	5,4 ±0,2	5,30	30	28	48-120 horas
Sabouraud Dextrosa Agar + Cloranfenicol	Ligeramente clara a ligeramente turbia	C	Beige claro a ámbar	C	Buena	C	5,6 ±0,2	5,52	25 - 30	25,27	2 -7 días

ANEXO H. Propiedades físico químicas de los medios de cultivo, segundo día.

Medio de cultivo	Apariencia teórica	Apariencia	Color teórico	Color	Estabilidad teórica del agar	Estabilidad del gel	pH teórico	pH Experimental	Temperatura teórica (°C)	Temperatura (°C)	Tiempo
DRBC	Ligeramente turbio	C	Rosa brillante	C	Buena	C	5,6 ±0,2	5,6	25-30	30,1	2-7 días
DG - 18	Ligeramente brumoso	C	Beige	C	Buena	C	5,6 ±0,2	5,48	25	25,31	7 días
Extracto de malta	De claro a brillante con o sin precipitado	C	Beige claro a oscuro	C	Buena	C	5,4 ±0,2	5,24	30	33	48-120 horas
Sabouraud Dextrosa Agar + Cloranfenicol	Ligeramente clara a ligeramente turbia	C	Beige claro a ámbar	C	Buena	C	5,6 ±0,2	5,47	25 - 30	32	2 -7 días

ANEXO I. Propiedades físico químicas de los medios de cultivo, tercer día.

Medio de cultivo	Apariencia teórica	Apariencia	Color teórico	Color	Estabilidad teórica del agar	Estabilidad del gel	pH teórico	pH Experimental	Temperatura teórica (°C)	Temperatura (°C)	Tiempo
DRBC	Ligeramente turbio	C	Rosa brillante	C	Buena	C	5,6 ±0,2	5,6	25-30	30,9	2-7 días
DG - 18	Ligeramente brumoso	C	Beige	C	Buena	C	5,6 ±0,2	5,48	25	27,4	7 días
Extracto de malta	De claro a brillante con o sin precipitado	C	Beige claro a oscuro	C	Buena	C	5,4 ±0,2	5,23	30	29,9	48-120 horas
Sabouraud Dextrosa Agar + Cloranfenicol	Ligeramente clara a ligeramente turbia	C	Beige claro a ámbar	C	Buena	C	5,6 ±0,2	5,45	25 - 30	28,8	2 -7 días

ANEXO J. Propiedades físico químicas de los medios de cultivo, cuarto día.

Medio de cultivo	Apariencia teórica	Apariencia	Color teórico	Color	Estabilidad teórica del agar	Estabilidad del gel	pH teórico	pH Experimental	Temperatura teórica (°C)	Temperatura (°C)	Tiempo
DRBC	Ligeramente turbio	C	Rosa brillante	C	Buena	C	5,6 ±0,2	5,56	25-30	27	2-7 días
DG - 18	Ligeramente brumoso	C	Beige	C	Buena	C	5,6 ±0,2	5,47	25	26,8	7 días
Extracto de malta	De claro a brillante con o sin precipitado	C	Beige claro a oscuro	Beige oscuro	Buena	Sin consistencia	5,4 ±0,2	5,14	30	27	48-120 horas
Sabouraud Dextrosa Agar + Cloranfenicol	Ligeramente clara a ligeramente turbia	C	Beige claro a ámbar	Beige oscuro	Buena	C	5,6 ±0,2	5,36	25 - 30	25,2	2 -7 días

ANEXO K. Propiedades físico químicas de los medios de cultivo, quinto día.

Medio de cultivo	Apariencia teórica	Apariencia	Color teórico	Color	Estabilidad teórica del agar	Estabilidad del gel	pH teórico	pH Experimental	Temperatura teórica (°C)	Temperatura (°C)	Tiempo
DRBC	Ligeramente turbio	Con grumos	Rosa brillante	C	Buena	C	5,6 ±0,2	5,55	25-30	31	2-7 días
DG - 18	Ligeramente brumoso	C	Beige	C	Buena	C	5,6 ±0,2	5,46	25	25,7	7 días
Extracto de malta	De claro a brillante con o sin precipitado	Con grumos	Beige claro a oscuro	Beige oscuro	Buena	Sin consistencia	5,4 ±0,2	5,13	30	29	48-120 horas
Saboraud Dextrosa Agar + Cloranfenicol	Ligeramente clara a ligeramente turbia	C	Beige claro a ámbar	Beige oscuro	Buena	C	5,6 ±0,2	5,32	25 - 30	30,9	2 -7 días

ANEXO L. Propiedades físico químicas de los medios de cultivo, sexto día.

Medio de cultivo	Apariencia teórica	Apariencia	Color teórico	Color	Estabilidad teórica del agar	Estabilidad del gel	pH teórico	pH Experimental	Temperatura teórica (°C)	Temperatura (°C)	Tiempo
DRBC	Ligeramente turbio	Con grumos	Rosa brillante	C	Buena	C	5,6 ±0,2	5,52	25-30	27	2-7 días
DG - 18	Ligeramente brumoso	C	Beige	C	Buena	C	5,6 ±0,2	5,45	25	26,6	7 días
Extracto de malta	De claro a brillante con o sin precipitado	Con grumos	Beige claro a oscuro	Beige oscuro	Buena	Sin consistencia	5,4 ±0,2	5,13	30	27	48-120 horas
Sabouraud Dextrosa Agar + Cloranfenicol	Ligeramente clara a ligeramente turbia	Con grumos	Beige claro a ámbar	Beige oscuro	Buena	C	5,6 ±0,2	5,28	25 - 30	31,4	2 -7 días