Verificación de Metodologías Microbiológicas aplicadas al Control de Calidad de los Productos “Vaso Kola” y “Chococono” en la Empresa Cremhelado Meals S.A

María Fernanda Barrera Vera

Universidad de Pamplona

Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas

Bogotá

2024

Verificación de Metodologías Microbiológicas aplicadas al Control de Calidad de los Productos “Vaso Kola” y “Chococono” en la Empresa Cremhelado Meals S.A

María Fernanda Barrera Vera

Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de Microbióloga.

Ramón Ovidio García Rico PhD.

Tutor académico, Departamento de Microbiología, Universidad de Pamplona.

Rafael Andrés Solano López

Tutor empresarial, Químico puro. Coordinador del Laboratorio Control de Calidad en Meals S.A

Bogotá

Universidad de Pamplona

Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas

Bogotá

2024

NOTA DE ACEPTACIÓN

_____

_____

_____

_____

_____

_____

TUTOR ACADÉMICO

_____

JURADO

_____

JURADO

Ciudad y Fecha (día, mes, año) (Fecha de entrega)

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN **11**

ABSTRACT **12**

1. INTRODUCCIÓN: **13**

2. JUSTIFICACIÓN **15**

3. OBJETIVOS **17**

3.1 OBJETIVO GENERAL 17

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17

4. MARCO TEÓRICO: **18**

4.1 HELADO E INOCUIDAD ALIMENTARIA. 18

4.1.1. Helado *18*

4.1.2. Inocuidad alimentaria *19*

4.2 PARÁMETROS DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA 20

4.2.1. Enterobacterias: *20*

4.2.2. *Salmonella* spp.*:* *21*

4.2.3. *Staphylococcus aureus:* *21*

4.2.4. *Listeria monocytogenes:* *22*

4.3 METODOLOGÍAS DE AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN 22

4.3.1. Sistema automático multiparamétrico de inmunoanálisis mini VIDAS® *23*

4.3.2. Recuento en placa *27*

4.4. MARCO LEGAL: 33

5. METODOLOGÍA 37

5.1. SELECCIÓN DE LA MATRIZ 39

5.2. CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO 40

5.3. CONTROL DE AMBIENTES 41

5.4. CONDICIONES AMBIENTALES 41

5.5. VERIFICACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO APLICADO PARA LA DETECCIÓN DE *SALMONELLA* SPP. SOBRE LA MATRIZ A BASE DE AGUA VASO KOLA. 41

5.5.1. Estandarización de la cepa *41*

5.5.2. Inoculación de la muestra *42*

5.5.3. Aplicación de la metodología de detección *43*

5.5.4. Procesamiento de las muestras *44*

5.6. VERIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO APLICADOS PARA LA DETECCIÓN DE ENTEROBACTERIAS, *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASA POSITIVO, *SALMONELLA* SPP. Y *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN EL PRODUCTO A BASE DE CREMA CHOCOCONO. 45

5.6.1. Estandarización de las cepas *45*

5.6.2. Inoculación de la muestra *47*

5.6.3. Procesamiento de las muestras: *51*

5.7. PARÁMETROS DE DESEMPEÑO Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN 51

5.7.1. Métodos cualitativos *51*

5.7.2. Métodos cuantitativos *54*

6. CRONOGRAMA 58

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 60

7.1. VERIFICACIÓN DE VARIABLES PRE-ANÁLISIS 60

7.2. HELADOS DE AGUA 66

7.2.1. Estandarización de cepas *66*

7.2.2. Salmonella spp. *(Salmonella* Typhimurium*)* *66*

7.3. HELADOS DE CREMA 69

7.3.1. Estandarización de cepas 69

7.3.2. Enterobacterias 70

7.3.3. Staphylococcus coagulasa positivo *72*

7.3.4. Salmonella spp. *y Listeria monocytogenes* *74*

8. CONCLUSIONES 79

RECOMENDACIONES 81

REFERENCIAS 83

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Criterios microbiológicos para helados establecidos en la Resolución 1407:2022 20

Tabla 2. Materiales y equipos utilizados 37

Tabla 3. Medios de cultivo, reactivos y cepas utilizadas 38

Tabla 4. Análisis microbiológico de los lotes seleccionados como matriz de ensayo.. 60

Tabla 5. Matriz de estudio 61

Tabla 6. Características de pH, esterilidad, productividad y selectividad de los medios de cultivo utilizados.. 65

Tabla 7. Características del control microbiológico de ambientes 66

Tabla 8. Inoculación media y baja aplicada a la matriz Vaso Kola. 65

Tabla 9. Resultados estadísticos de la verificación del método de detección para Salmonella spp. en la matriz Vaso Kola 67

Tabla 10. Inoculación media y baja aplicada a la matriz Chococono.. 70

Tabla 11. Resultados estadísticos de la verificación del método de recuento en placa de Enterobacterias en la matriz Chococono 71

Tabla 12. Resultados estadísticos de la verificación del método de recuento en placa de *Staphylococcus* coagulasa positivo en la matriz Chococono 73

Tabla 13. Resultados estadísticos de la verificación del método Detección de *Salmonella* spp. en la matriz Chococono 75

Tabla 14. Resultados estadísticos de la verificación del método Detección de *Listeria monocytogenes* en la matriz Chococono 75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Puntuación de las reacciones de la prueba de coagulasa 29

Figura 2. Esquema del método de siembra en estría modificado 40

Figura 3. Esquema del método se estandarización de la cepa de referencia *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 para el producto Vaso Kola. 42

Figura 4. Esquema del método de inoculación de los 10 lotes de Vaso Kola 43

Figura 5. Técnica de ensayo microbiológica aplicada al control de calidad del helado Vaso Kola 44

Figura 6. Esquema del método de estandarización de las cepas de referencia para el producto Chococono 46

Figura 7. Esquema del método de inoculación de los 10 lotes de Chococono 47

Figura 8. Técnicas de ensayo microbiológicas aplicadas para control de calidad del helado Chococono 49

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Límite de detección. 52

Ecuación 2. Sensibilidad 53

Ecuación 3. Especificidad 53

Ecuación 4. Repetibilidad 55

Ecuación 5. Reproducibilidad 56

Ecuación 6. Recuperación 56

Ecuación 7. Sesgo 56

Ecuación 8. Incertidumbre SR 57

Ecuación 9. Incertidumbre expandida (U) 57

ANEXOS

Anexo 1 . Análisis estadístico de la detección y cuantificación de Enterobacterias en la matriz Chococono, haciendo uso del medio VRBG. 88

Anexo 2 . Análisis estadístico de la detección de *Salmonella* spp. en la matriz Vaso kola y Chococono. 88

Anexo 3 . Análisis estadístico de la detección y cuantificación de *Staphylococcus* coagulasa positivo en la matriz Chococono..... 88

Anexo 4 . Análisis estadístico de la detección de *L. monocytogenes* en la matriz Chococono. 88

RESUMEN

Las metodologías empleadas en el control de calidad de alimentos destinados para el consumo humano, requieren de una verificación del desempeño para determinar si son adecuadas y, por consiguiente, generar un respaldo a los resultados de control establecidos.

Para verificar el desempeño de las metodologías microbiológicas aplicadas al control rutinario del producto terminado en la planta de producción de Crem Helado Meals SA, se llevó a cabo un proceso de evaluación de los métodos cuantitativos (recuento en placa) y métodos cualitativos (ausencia/presencia) utilizados en el control de calidad de helados a base de agua (Vaso Kola) y helados a base de crema (Chococono).

Los resultados obtenidos permitieron determinar que las metodologías de recuento en placa para el aislamiento de Enterobacterias, *E. coli*, y *S. aureus* cumplen con los criterios de aceptación establecidos, excepto por una leve variación en la recuperación obtenida por la metodología de aislamiento de Enterobacterias en Helados de crema. El método de ensayo de fluorescencia ligada a enzimas (ELFA) demostró ser apto para la detección de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*, siempre que se realice la metodología con rigurosidad, y sus resultados positivos sean rectificados por otras metodologías, como lo son los medios de cultivo selectivos y diferenciales.

ABSTRACT

The methodologies employed in the quality control of food intended for human consumption, require a performance verification to determine their adequacy and, therefore, provide support to the established control results.

To verify the performance of the microbiological methodologies applied in the routine control of the finished product in the production plant of Crem Helado Meals SA, an evaluation process of the quantitative (plate counting) and qualitative (absence/presence) methods used in the quality control of water-based ice cream (Vaso Kola) and cream-based ice cream (Chococono) was carried out.

The results obtained allowed determining that the plate counting methodologies for the isolation of *Enterobacteriaceae, E. coli*, and *S. aureus* meet the established acceptance criteria, except for a slight variation in the recovery obtained by the methodology for the Enterobacteriaceae isolation in ice cream. The enzyme-linked fluorescence assay (ELFA) method proved to be suitable for the detection of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*, provided that the methodology is performed rigorously, and its positive results are rectified by other methodologies, such as selective and differential culture media.

1. INTRODUCCIÓN:

Meals S.A es una empresa colombiana líder en la comercialización de helados, en la cual se fabrican y comercializan productos bajo las marcas Crem Helado y Country Hill, por medio de sus tres plantas de Producción ubicadas en Bogotá, Armenia y Manizales. Crem Helado es una empresa líder en la fabricación y comercialización de helados, fundada en 1920 la cual cuenta con una amplia variedad de productos logrando ventas superiores a 1,8 millones de helados al día en el país según Mario Niño, presidente de Meals SA (Crem Helado, s.f.).

La inocuidad alimentaria es un requisito básico de calidad que busca alimentos libres de contaminantes, adulterantes, y cualquier sustancia que pueda generar un riesgo en la salud del consumidor, por lo que, las empresas productoras de alimentos tienen el deber de suministrar alimentos con características favorables, operando en conformidad con los principios de las buenas prácticas de manufactura, permitiendo dar cumplimiento al marco normativo actual vigente (Mercado, 2007). A partir de esto, la empresa Crem Helado Meals S.A cuenta con la implementación de una Política Integral de Gestión, con un enfoque de Calidad e Inocuidad que enfatiza en el control de materias primas, procesos y productos mediante ensayos físicos-químicos y microbiológicos, con el fin de generar confianza en el consumidor, por medio de la oferta de helados inocuos con altos estándares de calidad (Crem Helado, s.f.).

Los ensayos microbiológicos establecidos en el plan de muestreo del Laboratorio de Control de Calidad de la planta de producción Floresta de la empresa Crem Helado ubicada en Bogotá, tienen entre sus objetivos el control de calidad del producto terminado, bajo los lineamientos establecidos por el Ministerio de Salud y Protección Social en la Resolución 1407 de 2022 para helados y mezclas según su composición (Ministerio de Salud y Protección Social

[MSPS], 2022), por medio de las metodologías establecidas por los Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación Oficial de Químicos Agrícolas (Association of Official Agricultural Chemists [AOAC], 2013) y las normas de la Organización Internacional de Normalización (International Organization for Standardization [ISO], 2017; 2021) las cuales requieren de una evaluación de desempeño con el fin de determinar si son adecuadas para el análisis de los alimentos de interés, a su vez, que se genera un respaldo a los resultados de control establecidos, y por consiguiente la búsqueda de posibles mejoras (Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura [CCAYAC], 2016). Para llevar a cabo esta verificación se eligieron las matrices representativas Vaso Kola y Chococono, en las que se verificó si las metodologías aplicadas para el control rutinario del producto terminado son adecuadas para la recuperación de los microorganismos de interés.

2. JUSTIFICACIÓN

Meals S.A es una empresa colombiana líder en la comercialización de helados del Grupo Nutresa, la cual cuenta con el establecimiento y aplicación de una Política Integral de Calidad e Inocuidad basado en el marco normativo actual vigente, permitiendo establecer los lineamientos del plan de muestreo microbiológico, que dentro de sus objetivos busca el monitoreo del producto destinado para comercialización, con el fin de obtener alimentos seguros para la salud del consumidor.

La Resolución 1407 (Ministerio de Salud y Protección Social, 2022), por la cual se establecen los criterios microbiológicos que deben cumplir los alimentos y bebidas destinados para el consumo humano, dando a disposición los parámetros microbiológicos de cumplimiento obligatorio para helados y mezclas para helados según su composición, a través de la los Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación Oficial Químicos Agrícolas (AOAC, 2013) y las normas de la Organización Internacional de Normalización (ISO, 2017; 2021) en las que se precisan los lineamientos a seguir para la detección de los diferentes microorganismos de interés.

Cada método de análisis que se implemente en el control de calidad de alimentos destinados para el consumo humano requiere de una verificación, la cual puede ser aplicada por los laboratorios en cualquier momento por medio del establecimiento de evidencia documental, que respalde el grado de cumplimiento de las especificaciones y atributos de calidad de las metodologías implementadas para el análisis de los grupos de alimentos de interés, respaldando la confiabilidad en los resultados obtenidos, y por ende facilitando la búsqueda de posibles mejoras (CCAYAC, 2016).

La implementación de estas verificaciones permiten generar información de las limitaciones en la aplicación metodologías de análisis, por medio de la detección de incertidumbres que se pueden mitigar bajo la implementación de acciones correctivas, generando confiabilidad en el correcto funcionamiento de los protocolos dentro de las actividades rutinarias de control, siendo un apoyo en el desarrollo de la mejora continua, lo que otorga confiabilidad en los resultados obtenidos y un mayor control de calidad de las variables objeto de medición (Instituto Nacional de Metrología de Colombia [INM], 2023). La verificación de las metodologías aplicadas al control de calidad permite la adecuada toma de decisiones, las cuales, en la industria alimentaria, tienen una gran importancia tanto en a nivel económico como de responsabilidad social, ya que de estas depende el rechazo o aceptación de los productos destinados a la comercialización y, por ende, la salud e integridad de los consumidores.

A partir de esto, se establece la necesidad de realizar la verificación de las metodologías microbiológicas aplicadas al control de calidad rutinario de los productos Vaso Kola y Chococono elaborados en la planta de producción floresta de la empresa Crem Helado Meals SA, por medio de evidencia documental que respalde el adecuado control de calidad y el desarrollo del enfoque de inocuidad alimentaria.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Verificar el desempeño de métodos de análisis microbiológico para los Productos “Vaso Kola” y “Chococono” elaborados en la Empresa Crem Helado Meals S.A

3.2. Objetivos específicos

- Determinar la validez del método de análisis microbiológico para la detección de *Salmonella* spp. en la matriz a base de agua Vaso Kola.

- Evaluar la efectividad de los métodos de análisis microbiológico aplicados para la detección de Enterobacterias, *Staphylococcus* coagulasa positivo, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en el producto a base de crema Chococono.

4. MARCO TEÓRICO:

4.1. Helado e inocuidad alimentaria.

4.1.1. Helado

El helado es un plato dulce congelado e higienizado, cuyo principio es una mezcla base obtenida a partir de la emulsión de grasas y proteínas, o a partir de una mezcla de agua, en conjunto con azúcar, dextrosa (como edulcorante o texturizador de la mezcla), jarabe de maíz, aditivos permitidos, que, al ser sometidos a batido según corresponda, evita la formación de grandes cristales de agua e incorpora aire haciendo la mezcla más cremosa para su posterior congelamiento, garantizando así la conservación del producto en todas sus etapas de almacenamiento, transporte y consumo final (Goff, 2013).

El helado en todas sus fases es un sistema fisicoquímico complejo, en la fase de producto terminado las burbujas de aire se encuentran en una fase líquida continua con cristales de hielo incrustados; en la fase líquida (en el caso del helado de leche) también contiene glóbulos de grasa solidificada, proteínas de la leche, sales insolubles y en algunos casos, cristales de lactosa, estabilizadores añadidos (gomas, almidones o proteínas) y demás aditivos cuya función es mantener la calidad del producto durante toda la cadena de producción hasta su posterior comercialización siendo este último un sistema trifásico compuesto de aire, sólido y líquido (Goff 2013).

El helado de agua es preparado con agua potable, azúcar y otros aditivos, como lo son la fruta, leche condensada, entre otros. Los helados de leche son preparados con leche, por lo que su única fuente de grasa y proteína es la láctea. También se encuentran los helados de leche con

grasa vegetal, cuya variación es que parte de su grasa es de origen vegetal (Norma Técnica Colombiana [NTC] 1239, 2002).

4.1.2. Inocuidad alimentaria

La inocuidad alimentaria tiene como enfoque el desarrollo de alimentos seguros, por medio de la aplicación de metodologías que permitan garantizar alimentos libres de contaminantes que pongan en riesgo la salud del consumidor. Estas metodologías buscan simultáneamente el desarrollo de productos con altos estándares de calidad mitigando la incidencia de Enfermedades Transmitidas Por Alimentos (ETAs), siendo estas reconocidas como un problema de salud pública debido al aumento en morbilidad y mortalidad que representan, y las repercusiones económicas relacionadas a la productividad (Ortiz et al., 2011).

4.1.2.1. Control de calidad

Con el fin de garantizar la inocuidad alimentaria, las empresas productoras de alimentos tienen el deber de implementar medidas de control de materias primas, procesos y productos mediante ensayos físicos-químicos y microbiológicos que garanticen alimentos libres de contaminantes, adulterantes, y cualquier sustancia que pueda generar un riesgo en la salud del consumidor. En la Resolución 1407 del Ministerio de Salud y Protección Social (2022) se establecen los criterios microbiológicos que deben cumplir los alimentos y bebidas destinados para consumo humano, en donde se especifican los parámetros para helados y mezclas para helados presentados en la Tabla 1 (Ministerio de Salud y Protección Social, Resolución 1407, 2022, pág. 15).

Tabla 1.

Criterios microbiológicos para helados establecidos en la Resolución 1407:2022

Helados y Mezclas Para Helado						
Parámetro	**Caso**	**Muestreo Clase**	**n**	**c**	**m**	**M**
Helados de agua						
Escherichia coli	NA	3	5	0	<10 ufc/g o ml	-
Salmonella spp.	10	2	5	0	Ausencia/25g	-
Helados de crema, de leche, de leche/con grasa vegetal						
Enterobacterias	2	3	5	2	10 ufc/g o ml	10^2 ufc/ g o ml
Staphylococcus coagulasa positivo	8	3	5	1	10^2 ufc/g o ml	$2x10^2$ ufc/g o ml
Salmonella spp.	10	2	5	0	Ausencia/25g	-
Listeria monocytogenes	10	2	5	0	Ausencia/25g	-

Nota: La tabla establece los parámetros de aceptación microbiológica para los helados y mezclas para helados, según su composición (Helados de agua; Helados de crema, de leche, de leche/con grasa vegetal). Tomado del Ministerio de Salud y Protección social, Resolución 1407, (2022). Fuente: (Ministerio de Salud y Protección Social, Resolución 1407, 2022, pág. 15).

4.2. Parámetros de calidad microbiológica

4.2.1. Enterobacterias:

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por bacterias de tipo Gram negativas, aeróbicas o anaeróbicas facultativas, con forma de bacilo, fermentadores de glucosa, que crecen bien en medios artificiales. Esta familia presenta especies con características no motiles, y motiles, las cuales presentan flagelos perítricos. Las Enterobacterias forman parte de la

microbiota intestinal y de otros órganos del ser humano y de otras especies animales, por lo que, es un grupo importante en la industria alimentaria para monitorear la higiene y el saneamiento. Este grupo comprende un gran número de bacterias causantes de ETAs, como lo son *Salmonella* y *E. coli*, entre otras (Mladenović et al., 2021).

4.2.2. *Salmonella* spp.:

Los microorganismos del género *Salmonella* son bacilos, gram negativos, anaerobios facultativos, móviles con flagelos perítricos. Este género se halla ampliamente distribuido en la naturaleza, y el tracto gastrointestinal de los mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves e insectos. Una gran cantidad de especies de *Salmonella* producen una variedad de enfermedades en el hombre y los animales. La salmonelosis es una infección del tracto gastrointestinal transmitida por los alimentos, con altas tasas de incidencia, que ocasiona diarrea, náuseas, vómitos, fiebre baja, malestar general, dolor de cabeza y dolor muscular (Parra et al., 2002).

4.2.3. *Staphylococcus aureus*:

Es un coco gram positivo, no móvil. no productor de esporas, anaerobio facultativo, catalasa y coagulasa positivo. Pertenece a la familia *Staphylococcaceae*, género *Staphylococcus*, el cual contiene más de 30 especies diferentes y en su mayoría son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas del hombre. *S. aureus* es reconocido como patógeno, ya que produce una amplia gama de enfermedades, entre las que se encuentran lesiones superficiales de la piel, abscesos, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, endocarditis, infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario e infecciones nosocomiales. Este microorganismo es de preocupación en la industria alimentaria ya que, produce intoxicación al

liberar enterotoxinas en los alimentos, produciendo el síndrome del shock tóxico, además de septicemia, impétigo y fiebres (Bustos-Martínez et al., 2006).

4.2.4. *Listeria monocytogenes*:

Microorganismo perteneciente a la familia *Listeriaceae*, gram positivo, con forma bacilar, anaerobio facultativo, catalasa positivo, no esporulado, motil con flagelos perítricos. Esta bacteria se transmite en los humanos principalmente a través de los alimentos, causando gastroenteritis leve, infecciones graves del torrente sanguíneo y/o el sistema nervioso central, aborto, entre otras patologías dependiendo de la susceptibilidad del huésped. La listeriosis grave presenta una tasa de letalidad entre el 20-30%, y debido a la alta capacidad de *L. monocytogenes* de sobrevivir en superficies de la industria alimentaria, como pisos, desagües, frigoríficos, entre otros, su control y prevención es motivo de gran preocupación para la salud pública y los fabricantes de alimentos (Kathariou, 2002).

4.3. Metodologías de aislamiento y cuantificación

Para determinar el cumplimiento de los parámetros establecidos en la Tabla 1, se aplican las metodologías establecidas por los Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación Oficial de Químicos Agrícolas (AOAC, 2013) y las normas de la Organización Internacional de Normalización (ISO, 2017; 2021), las cuales describen los protocolos empleados para el aislamiento y cuantificación de los diferentes microorganismos de interés, con el fin de generar resultados confiables, garantizando el desarrollo de alimentos libres de estos contaminantes, mitigando las ETAs y generando confianza en los consumidores.

4.3.1. Sistema automático multiparamétrico de inmunoanálisis mini VIDAS®

El aislamiento de *Salmonella* spp. y *Listeria* spp. en muestras de alimentos por medio de la metodología clásica puede conllevar dificultades, debido a que las concentraciones de estos contaminantes patógenos pueden ser relativamente bajas, impidiendo su adecuada detección, por lo que, el uso de metodologías inmunológicas puede apoyar y agilizar la detección, otorgando resultados con mayor fiabilidad, y permitiendo garantizar al consumidor alimentos libres de agentes productores de ETAs (Baylis et al., 2000).

4.3.1.1. Método VIDAS® *Listeria monocytogenes* Xpress (LMX)

El método VIDAS *Listeria monocytogenes* Xpress (LMX) para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos, descrito por los Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación Oficial de Químicos Agrícolas en el documento AOAC 2013.11 establece la metodología haciendo uso del instrumento automatizado mini VIDAS para la detección de antígenos del microorganismo de interés (AOAC 2013.11, 2013). Para llevar a cabo la metodología de detección en la fase inicial se debe llevar a cabo un pre-enriquecimiento haciendo uso del caldo Bouillon LMX combinado con el suplemento liofilizado LMX, el cual posee una composición rica en peptonas y cumple funciones amortiguadoras manteniendo el pH en condiciones cercanas al neutro, permitiendo el óptimo desarrollo de *L. monocytogenes*, a la vez que brinda condiciones de selectividad inhibiendo las bacterias gran negativas por sus componentes cloruro de litio, acriflavina, ácido nalidíxico, y antibióticos presentes en el suplemento (bioMérieux , 2014). Una vez pasado el periodo de pre-enrriquecimiento se hace uso del Receptáculo de fase sólida (Solid Phase Receptacle, SPR) que cuenta con una recubierta de proteínas específicas para los

receptores de *L. monocytogenes*, en el que se dispensa una alícuota de caldo de enriquecimiento, y se ingresa al equipo para continuar con el proceso de detección. Dentro del instrumento automatizado el medio de reacción entra y sale del SPR varias veces, y dado el caso de que la prueba sea positiva, los receptores de *L. monocytogenes* presentes se unirán al interior del SPR, y por consiguiente los componentes no unidos se eliminan durante los pasos de lavado. Continuo a esto las proteínas conjugadas con la fosfatasa alcalina entran y salen del SPR y se unen a cualquier receptor de *L. monocytogenes* unido a la pared del SPR, pasando a un lavado final en el que se elimina el conjugado no unido. Durante el paso de detección final, el sustrato (fosfato de 4-metil-umbeliferil) entra y sale del SPR, en donde la enzima conjugada cataliza la hidrólisis del sustrato, dando como resultado un producto fluorescente (4-metilumbeliferona), el cual es medido a 450 nm, permitiendo que el equipo calcule automáticamente un valor de prueba para cada muestra, realizando una comparación con referencias internas (umbrales), lo que otorga un resultado que se interpreta como positivo o negativo, en donde los resultados positivos son mayor o igual al umbral (≥ 0,05) indicando que la muestra puede estar contaminada con *L. monocytogenes*, y los negativos tienen un valor de prueba menor al umbral (< 0,05) indicando que la muestra no contiene *L. monocytogenes* o lo contiene en una concentración inferior al límite de detección. Los resultados presuntivos positivos de VIDAS LMX pueden confirmarse por medio de la metodología de aislamiento por estría en placas de agar selectivo (AOAC 2013.11, 2013).

Confirmación de resultados presuntivos positivos

A pesar de la confiabilidad que generan los métodos inmunológicos, es necesario confirmar los resultados arrojados como positivos a través del uso de medios de cultivo, que permitan rectificar el resultado entregado. El agar para *Listeria* Brilliance es un medio de cultivo de tipo cromogénico para la detección presuntiva de especies de *Listeria* spp., como *Listeria monocytogenes*. Este medio contiene un cromógeno X-glucósido, que es escindido por la actividad β-glucosidasa típica de especies de *Listeria* spp. El medio contiene agentes selectivos (cloruro de litio, poliximina B y ácido nalidíxico) que inhiben otros microorganismos con actividad β-glucosidasa, como los enterococos, y la anfotericina inhibe el crecimiento de levaduras y mohos. El medio cuenta con lecitina, que es hidrolizada por la enzima fosfolipasa (lecitinasa), diferenciando a *L. monocytogenes* y la *L. ivanovii* patógena, ya que la primera produce esta enzima produciendo un halo blanco opaco alrededor de la colonia (Thermo Scientific, 2023)

4.3.1.2. Método VIDAS® UP *Salmonella* (SPT)

El método VIDAS *UP Salmonella* (SPT) para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos, establecido en el documento AOAC 2013.01 por los Métodos Oficiales de Análisis de la Asociación Oficial de Químicos Agrícolas, en el que se describe la metodología de detección haciendo uso del instrumento automatizado mini VIDAS (AOAC 2013.01, 2013). En el desarrollo la metodología se establece en su fase inicial un pre-enrriquecimiento haciendo uso de Agua peptona tamponada, medio liquido recomendado por la Organización Internacional de Normalización (ISO, 2017) en la norma ISO 6579-1:2017 para aumentar la recuperación de las

células de *Salmonella* spp. (ISO 6579-1, 2017), combinado con el suplemento liofilizado *Salmonella*. Continuo al pre-enrriquecimiento se desarrolla el fundamento mencionado previamente haciendo uso del instrumento automatizado mini VIDAS, con la variación de que el interior del SPR está recubierto con anticuerpos policlonales de conejo contra *Salmonella* spp., en el que los antígenos presentes se unirán a los anticuerpos anti-*Salmonella.* Una vez los resultados son analizados automáticamente por el sistema VIDAS, se imprime un informe que registra el resultado como positivo o negativo, en donde el resultado positivo tiene un valor de prueba mayor o igual al umbral (≥ 0,25) indicando que la muestra puede estar contaminada con *Salmonella* spp. y el resultado negativo tiene un valor inferior al umbral (< 0,25), lo que indica la ausencia de *Salmonella* spp. en la muestra, o en su defecto presencia en una concentración menor al límite de detección. Al obtener resultados presuntivos positivos se pueden realizar la confirmación por medio de la metodología de aislamiento por estría en placas de agar selectivo (AOAC 2013.01, 2013).

Confirmación de resultados presuntivos positivos

El medio de cultivo Xilosa - Lisina – Desoxicolato (XLD), es de tipo selectivo para el aislamiento bacterias Gram negativas tolerantes a la bilis, como lo son *Salmonella* spp. y *Shigella* spp., su selectividad es producto del desoxicolato de sodio, que permite la inhibición de bacterias coliformes, y su capacidad diferencial se fundamenta en la fermentación de la xilosa, siendo rápida en las bacterias entéricas excepto el género *Shigella* spp., entre otras. *Salmonella* spp. se puede diferenciar de los fermentadores de xilosa no patógenos por su capacidad de descarboxilar la lisina presente en el medio, produciendo un aumento de pH conservando el

medio neutro (rojo), y reduce el tiosulfato originando colonias con centro negro (Thermo Scientific, s.f.).

4.3.2. Recuento en placa

4.3.2.1. Enterobacterias

La detección y recuento de Enterobacterias se realiza a través del uso del medio VRBG (Bilis Glucosa con cristal violeta y rojo neutro) adecuado para alimentos, el cual contiene sales biliares y cristal violeta que inhiben el desarrollo las bacterias Gram positivas. El medio contiene glucosa, que le permite recuperar todas las enterobacterias, las cuales fermentan rápidamente la glucosa, causando una reducción en el pH del medio, lo que ocasiona el viraje del indicador rojo neutro y cristal violeta, produciendo colonias de color púrpura/rosa, rodeadas de una zona rojiza de bilis precipitada (Thermo Scientific, s.f.)

4.3.2.2. *Staphylococcus* coagulasa positivo

El medio de cultivo Baird Parker es utilizado para el aislamiento y recuento de *Staphylococcus* coagulasa positiva en alimentos, debido a que este medio es altamente especifico, siendo selectivo y diferencial, ya que posee en su composición glicina, litio y telurito que suprimen el crecimiento de la mayoría de las bacterias presentes en los alimentos, sin inhibir los estafilococos coagulasa positivos, que por medio del piruvato de sodio se brinda protección a las células dañadas, permitiendo una mayor recuperación. La yema de huevo permite evidenciar la actividad lecitinásica de los microorganismos al formar un halo claro alrededor de la colonia y, la reducción de telurito a teluro origina colonias de color grisáceo-negro, siendo estas características típicas para estafilococos coagulasa positivos (Thermo Fisher, s.f.).

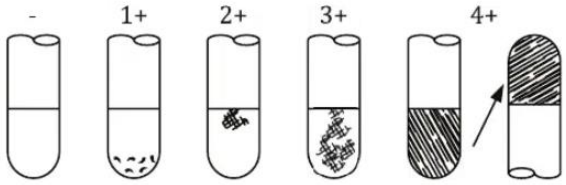
Confirmación de resultados presuntivos positivos

Debido a que los estafilococos coagulasa positivos pueden exhibir colonias tanto típicas como atípicas en la superficie del medio de cultivo selectivo Baird-Parker, es importante notar sus características distintivas. Las colonias típicas se caracterizan por una morfología negra/gris, brillantes, convexas, con un diámetro de 1mm - 1,5 mm a las 24 h ± 2 h de incubación, y un diámetro de 1,5 mm - 2,5 mm a las 48 h ± 4 h incubación, rodeadas por una zona clara parcialmente opaca en la que a las 24 h de incubación se puede formar un anillo opalescente en contacto inmediato con las colonias. Por otro lado, las colonias atípicas pueden presentar diversas morfologías, como colonias negras y brillantes, con o sin un borde blanco estrecho, y con una zona clara ausente o poco visible, al igual que el anillo opalescente. También pueden encontrarse colonias de color gris, sin presencia de zonas claras (ISO 6888-1, 2021). A demás de esto, los estafilococos coagulasa positivos muestran una reacción de coagulasa positivo, como ejemplo de esto es el patógeno *Staphylococcus aureus,* que produce dos tipos de coagulasa, una libre que es una enzima de tipo extracelular, y una coagulasa unida que se localiza en la superficie de la pared celular del microorganismo (Merck Millipore, 2023). Estas dos coagulasas se pueden detectar por medio del test en tubo con plasma de conejo rehidratado, por lo que una vez obtenidas las colonias típicas y atípicas en el medio selectivo Baird Parker, se puede realizar una diferenciación de los estafilococos coagulasa positivos de los coagulasa negativos aplicando este test en aproximadamente 5 colonias típicas si solo hay presencia de típicas, 5 atípicas si solo hay atípicas, o 5 típicas y 5 atípicas si se presentan las dos morfologías, las cuales se incuban por separado en caldo BHI por 24 h ± 2 h a 34 °C - 38 °C. Pasado el periodo de incubación en un tubo estéril se añade 0,3 ml de plasma de coagulasa de conejo rehidratado y 0,1 ml de cada

cultivo, y se lleva a incubar a 34 °C - 38 °C por 5 ± 1 h, si pasado este tiempo no se evidencia reacción positiva, se realiza observación a las 24 h ± 2 h de incubación. Una prueba se considera positiva si los cultivos producen la reacción 3+ y 4+, e intermedia al producir la reacción 1 + y 2 +, como se muestra en el Figura 1. La prueba es negativa cuando no se evidencia coagulación del plasma (ISO 6888-1, 2021).

Figura 1

Puntuación de las reacciones de la prueba de coagulasa



Nota: La figura ilustra las diferentes reacciones que se pueden dar al realizar la confirmación de coagulasa positiva por medio del test en tubo con plasma de conejo rehidratado, pasadas 24 h de incubación. Las reacciones son: (-): negativa al no presentar formación de coágulo; (1+): intermedia al tener presencia de pequeños coágulos desorganizados; (2+): intermedia al tener presencia de un coágulo organizado pequeño intermedio; (3+): positiva evidenciando la formación de un coágulo grande y organizado; (4+): positiva debido a que el contenido del tubo se coagula y no se desplaza cuando se invierte el tubo. Tomado de ISO 6888-1:2021 [Organización Internacional de Normalización], 2021. Fuente: (ISO 6888-1, 2021, pág. 7).

4.4.Verificación

La verificación de un método se logra al aportar evidencia objetiva de que un ítem dado satisface los requisitos especificados, para ello se debe asegurar que el método o procedimiento específico fue implementado correctamente. A partir de esto se realizan las determinaciones estadisticas de los parametros de desempeño, bajo criterios de aceptación establecidos. Estos parámetros de desempeño estan establecidos según el tipo de metodología objeto de verificación, siendo estos de tipo cualitativo o cuantitativo (CCAYAC- CR-018, 2016).

4.4.1. Parámetros cualitativos

4.4.1.1. Límite de detección:

Está enmarcado por el número más pequeño de microorganismos en la muestra que pueden ser detectados en el análisis (CCAYAC- CR-018, 2016).

4.4.1.2. Selectividad:

Hace referencia a la capacidad de un método específico de detectar una cepa específica de interés estando en presencia también de la cepa interferente. Es decir, es la capacidad de identificar y cuantificar la cepa de interés sin que se afecte de manera significativa por la presencia de otras sustancias que se puedan encontrar en la muestra y podrían afectar la medición (CCAYAC- CR-018, 2016).

4.4.1.3. Falsos positivos:

Cuando el método empleado indica de manera incorrecta la presencia de la cepa de referencia cuando en realidad no está presente (CCAYAC- CR-018, 2016).

4.4.1.4. Falsos negativos

Cuando el método empleado indica incorrectamente la ausencia de la cepa de referencia cuando en realidad esta se encuentra presente (CCAYAC- CR-018, 2016).

4.4.1.5. Repetibilidad

La repetibilidad del método consiste en la variabilidad bajo condiciones similares en pro de asegurar la robustez y aplicabilidad de dicho método. Esta conlleva una evaluación subjetiva de esta robustez dentro del mismo laboratorio con parámetros a tener en cuenta, por ejemplo: periodicidad de la aplicación del método y la habilidad del analista (CCAYAC- CR-018, 2016).

4.4.1.6.Reproducibilidad

Se calcula al realizar el mismo procedimiento analítico a diferentes porciones de la matriz bajo diferentes condiciones e intervalos, se deben tener en cuenta algunos parámetros como el poder comparar los resultados entre distintos laboratorios, la experiencia de los analistas y la asimilación del método aplicado (CCAYAC- CR-018, 2016).

4.4.1.7. Sensibilidad

La capacidad de detectar la cepa de interés cuando realmente se encuentra presente (verdadero positivo), en otras palabras, es la proporción de resultados positivos identificados correctamente (CCAYAC- CR-018, 2016).

4.4.1.8. Especificidad

Evalúa la capacidad de descartar correctamente los resultados negativos (verdadero negativo) identificados en proporción al total de muestras negativas (CCAYAC- CR-018, 2016).

4.4.1.9. Incertidumbre

Se mencionan las fuentes de incertidumbre asociadas a las mediciones (CCAYAC- CR-018, 2016):

- Distribución de los microorganismos en la muestra.
- Personal operativo.
- Mediciones (pesada o medición de la muestra).
- Homogeneización, diluciones.
- Calidad de los medios.
- Tiempo hasta la inoculación.
- Temperatura de incubación.

4.4.2. Parámetros cuantitativos

4.4.2.1. Repetibilidad

Cada método tiene una variabilidad inherente del método en sí, frente a diferentes escenarios. La repetibilidad del método consiste en la variabilidad bajo condiciones similares para asegurar la robustez y aplicabilidad de dicho método. Se obtiene al aplicar el mismo procedimiento analítico a diferentes porciones de la misma matriz bajo las mismas condiciones (CCAYAC- CR-018, 2016).

4.4.2.2. Reproducibilidad

Se calcula al realizar el mismo procedimiento analítico a diferentes porciones de la matriz bajo diferentes condiciones e intervalos (CCAYAC- CR-018, 2016).

4.4.2.3. Recuperación

En base a los datos obtenidos en repetibilidad en muestras inoculadas, se debe calcular la cantidad de UFC en cada repetición y el logaritmo de cada resultado. Se debe recuperar con precisión la cantidad de cepa de interés. Se expresa de manera porcentual, denotando la capacidad del método para recuperar la cea de interés (CCAYAC- CR-018, 2016).

4.4.2.4. Sesgo

Hace referencia a la diferencia entre el valor esperado del análisis y un valor aceptado de referencia, dicho de otra manera, caracteriza la tendencia de los datos de alejarse del valor real, tendencia a sobreestimarse o subestimarse dependiendo de los resultados obtenidos (CCAYAC-CR-018, 2016).

4.4.2.5. Incertidumbre

Partiendo de las diferentes muestras tomadas por ambas analistas simultáneamente, se calculará de manera estadística que ayudarán a cuantificar la dispersión de los datos obtenidos en el proceso de medición (CCAYAC- CR-018, 2016).

4.5. Marco legal:

Ministerio de Salud y Protección Social. Resolución 1407 de 2022, por la cual se establecen los criterios microbiológicos que deben cumplir los alimentos y bebidas destinados para consumo humano, las cuales son de cumplimiento obligatorio en todo el territorio nacional. En esta resolución se disponen los parámetros microbiológicos que deben cumplir los helados y mezclas para helados según su composición, con el objetivo de preservar la salud del consumidor (Resolución 1407, 2022, pág. 15).

Norma Técnica Colombiana. NTC 1239 de 2002, por la cual se especifican los requisitos que deben cumplir los helados y las mezclas para helados. En esta normativa se esablecen las diversas definiciones, clasificaciones y designaciones de los helados y mezclas para helados (NTC 1239, 2002, pág. 1 - 4).

Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) Official Methods 2013.11 "Método oficial de la Asociación Oficial Químicos Agrícolas 2013.11. *Listeria monocytogenes* en variedad de alimentos. Método VIDAS® *Listeria monocytogenes* Xpress (LMX)", por el cual se establecen los Métodos Oficiales de Análisis para la detección de *L. monocytogenes* en diversos alimentos haciendo uso del instrumento automatizado mini VIDAS para la detección de los antígenos de *L. monocytogenes* (AOAC 2013.11, 2013).

Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) Official Methods 2013.01 "Método oficial de la Asociación Oficial Químicos Agrícolas 2013.01. *Salmonella* en variedad de alimentos. Método VIDAS® Método UP *Salmonella* (SPT)", por la cual se establece la metodología empleada para la detección de *Salmonella* spp. en diferentes muestras de alimentos, basándose en el uso del instrumento automatizado mini VIDAS, a través de la detección de antígenos por medio del método de ensayo de fluorescencia ligada a enzimas (ELFA) (AOAC 2013.01, 2013).

International Organization for Standardization (ISO) 6579-1, 2017: "Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección, enumeración y serotipificación de *Salmonella*. Parte 1: Detección de *Salmonella* spp.", en el que se describe un método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. en alimentos, alimentos para animales, heces de animales, y muestras ambientales de etapas de producción primeria. En la descripción del método horizontal

establecido en este documento, se establecen la etapa de pre-enriquecimiento con medio liquido no selectivo, haciendo uso del Agua peptona tamponada (ISO 6579-1, 2017, pág. 2).

International Organization for Standardization (ISO) 6888-1, 2021: "Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa positivos (*Staphylococcus aureus* y otras especies). Parte 1: Método utilizando el medio agar Baird-Parker.", por el cual se establece la metodología empleada para el aislamiento e identificación de *S. aureus* en diferentes muestras de alimentos, basándose en la técnica de siembra en superficie, y posterior confirmación de colonias presuntivas por medio de la prueba coagulasa haciendo uso del plasma de coagulasa de conejo (ISO 6888-1, 2021).

International Organization for Standardization (ISO) 21528-1, 2017: "Microbiología de la cadena alimentaria, Método horizontal para la detección y enumeración de *Enterobacteriaceae*. Parte 2: Técnica de conteo de colonias". En este documento se establece el método para la enumeración de *Enterobacteriaceae*, aplicable a productos destinados al consumo humano y animal, y muestras ambientales para la producción en etapa primaria, producción de alimentos y distribución de alimentos (ISO 21528-1, 2017).

Una Norma Española (UNE) Norma Europea (EN) Organización Internacional de Normalización (ISO) (UNE-EN ISO) 11133-1:2001: "Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Guía para la preparación y producción de medios de cultivo. Parte 1: Directrices generales para el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio". En este documento se establece la metodología de desarrollo para el método de análisis por ecométrico en la evaluación de la eficiencia de los medios de cultivo,

determinando su productividad y selectividad, indicando si es adecuado para el desarrollo de análisis microbiológicos confiables (UNE-EN ISO 11133-1, 2001)

Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAyAC) CCAYAC-CR-018: "Criterios para la evaluación del desempeño de métodos de prueba microbiológicos para el análisis de alimentos", por medio del cual La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) de México, a través de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAyAC, 2016) proporcionan los criterios para la evaluación del desempeño de métodos de prueba microbiológicos para el análisis de alimentos, buscando que estos emitan resultados confiables y oportunos para la adecuada toma de decisiones (CCAYAC-CR-018, 2016).

Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes (CNRPyC) MEC-PR-GVM 2022.06: "Guía de Validación de Métodos Microbiológicos", por medio de la cual el Centro Nacional de Referencia de Inocuidad y Bioseguridad de Inocuidad y Bioseguridad Agroalimentaria (CNRIBA) de México, a través del Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes (CNRPyC, 2022) proporcionan los lineamientos y criterios para realizar la evaluación de desempeño de los métodos de detección cualitativos, proporcionando evidencia objetiva que le otorgue robustez a los resultados obtenidos (Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes [CNRPyC], 2022)

5. METODOLOGÍA

Las metodologías de control de calidad para producto terminado aplicadas en la empresa Crem Helado Meals S.A planta floresta, sobre las matrices de Helados a base de agua y Helados a base de crema, requieren una verificación de idoneidad que respalde el uso de estas en las actividades rutinarias de control. A partir de esto se hizo uso de los materiales y equipos relacionados en la Tabla 2, los cuales al momento del desarrollo del estudio cumplían con el mantenimiento y calibración establecido por las operaciones de metrología de la empresa.

Tabla 2.

Materiales y equipos utilizados

Materiales y equipos	Marca	Código
Incubadora de 25 ± 1°C	Memmert	10101075
Incubadora de 35 ± 1°C	Memmert	10101073
Incubadora de 30 ± 1°C	Memmert	10101071
Incubadora de 37 ± 1°C	Memmert	10101072
Incubadora de 41 ± 1°C	Memmert	10101074
Balanza electrónica	Mettler Toledo	10025383
Baño de agua a 45°C ± 2°C	Shimaden	10025382
pHmetro ± 0.1	Hach	10050293
Autoclave	Serilof	10025372.
Vortex	VWR	10056709
Cabina de flujo laminar	Streamlie SCV-4ª	10025376
Micropipetas	Brand	10053097 y 10026336
Microscopío	Olympus	10025389
Heat & go	Techne 37etri Dri-Block DB-3D	10025391
Equipo miniVIDAS.	BioMérieux	10025392
Cajas de petri estériles de 90 a 100 mm.	Kasalab	N/A
Frascos de vidrio estériles.	N/A	N/A
Tubos tapa rosca.	N/A	N/A
Puntas estériles	N/A	N/A
Asas desechables	Biologix	N/A

Del mismo modo, en la Tabla 3 se relacionan los medios de cultivo, reactivos y cepas utilizados en el desarrollo del presente estudio, los cuales fueron previamente aprobados, con fechas de caducidad lejanas al momento de llevar a cabo la verificación.

Tabla 3.

Medios de cultivo, reactivos y cepas utilizadas

Medio de cultivo / Reactivos / Cepas	Lote	Fabricante	Fecha vencimiento
Cloruro de sodio	K53298304137	Millipore	12/02/2024
Peptona	VM889143924	Millipore	7/03/2025
Agar VRBG (Violeta rojo y bilis glucosa)	VM1102750500	Millipore	17/01/2025
Caldo BHI (Infusión cerebro corazón)	VM879793923	Millipore	21/11/2024
Agar PCA (Recuento en placa)	VM968163118	Millipore	1/11/2025
Agar YGC (extracto de levadura, glucosa, cloranfenicol)	VM964400116	Millipore	5/03/2025
Agua Peptonada bufferada	VM955028103	Millipore	18/04/2025
Agar XLD (Xilosa lisina desoxicolato)	VM942387037	Millipore	1/02/2025
Agar Baird Parker	VM882766928	Millipore	5/08/2024
Yema de huevo con telurito	K95827385	Millipore	2/09/2024
Prueba coagulasa (Plasma coagulasa de conejo)	K113306	Millipore	12/09/2024
Caldo Bouillon LMX	K75257585	Millipore	5/06/2024
Agar brillante Listeria	3203197	Oxoid	15/03/2025
Suplemento caldo Bouillon LMX	K233876	Millipore	3/07/2024
Suplemento *Salmonella* para Agua peptona bufferada	K314971	Millipore	12/03/2025
Suplemento SRO227E y SRO228E para Agar Brillante Listeria	3365759 / 3592604	Oxoid	10/04/2025
Kit vidas *Listeria monocytogenes* (Cartuchos y conos).	L924	Biomerieux	3/07/2024
Kit vidas *Salmonella* (Cartuchos y conos).	S826	Biomerieux	9/08/2024
Escherichia coli	ATCC 25922	KWIK-STIK	30/09/2024
Staphylococcus aureus	ATCC 25923	KWIK-STIK	30/07/2024
Salmonella Typhimurium	ATCC 14028	KWIK-STIK	30/11/2024
Listeria monocytogenes	ATCC 25921	KWIK-STIK	30/08/2024

5.1. Selección de la matriz

Se utilizaron matrices representativas para la empresa, seleccionando el producto 'Vaso Kola' como muestra de helado a base de agua, y el producto 'Chococono' como helado a base de crema. De cada matriz se recolectaron 15 lotes durante 6 semanas, comprendidos en cajas de 24 y 12 unidades respectivamente, los cuales fueron almacenados en congelación a -20°C. Se tomaron 3 unidades al azar por cada lote, a lo cuales se les realizo los análisis microbiológicos descritos en la Tabla 4, según los lineamientos establecidos por la Resolución 1407 para la determinación de la calidad microbiológica de los helados y mezclas para helado (Ministerio de Salud y Protección Social, Resolución 1407, 2022, pág. 15).

Tabla 4.

Análisis microbiológico aplicado a los lotes seleccionados como matriz de ensayo.

Parámetro	Rango de aceptación	Metodología	Normativa
Helados de agua			
Salmonella spp.	Ausencia/25g	Método VIDAS® UP *Salmonella* (SPT)	(AOAC 2013.01, 2013).
Helados de crema, de leche, de leche/con grasa vegetal			
Enterobacterias	10 ufc/g o ml / 10^2 ufc/ g o ml	Método horizontal para la detección y enumeración de *Enterobacteriaceae*	(ISO 21528-1, 2017).
Staphylococcus coagulasa positivo	10^2 ufc/g o ml	Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa positivos (*Staphylococcus aureus* y otras especies).	(ISO 6888-1, 2021).
Salmonella spp.	Ausencia/25g	Método VIDAS® UP *Salmonella* (SPT)	(AOAC 2013.01, 2013).

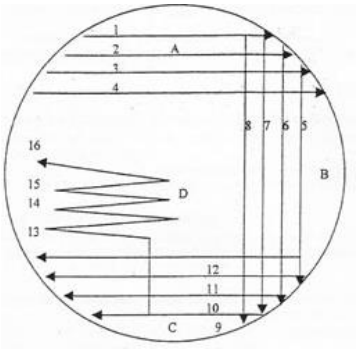
Listeria monocytogenes	Ausencia/25g	Método VIDAS® *Listeria monocytogenes* Xpress (LMX)	(AOAC 2013.11, 2013).

5.2. Control de calidad de medios de cultivo

A los medios de cultivo referenciados en la Tabla 3 se les realizó control de pH empleando un pHmetro; Control de esterilidad llevando una caja de Petri con el medio evaluado a incubar durante el tiempo y temperatura estipulada para cada medio, pasado este periodo de incubación se verificó la ausencia de crecimiento microbiano contaminante; Control de productividad y selectividad, haciendo uso de los microorganismos de referencia en una concentración de 10^2 UFC/mL, y en contraposición un microorganismo interferente con una concentración de 10^6 UFC/mL, los cuales fueron analizados por medio del método ecométrico de siembra en estrías para medios sólidos (Figura 1), y por medio del método cualitativo (turbidez) con un solo tubo, para medios líquidos, según los lineamientos establecidos por la UNE-EN ISO 11133-1 (2001).

Figura 2.

Esquema del método de siembra en estría modificado



Nota: La figura representa el esquema de siembra en la ejecución de la prueba ecométrica. Tomado de UNE-EN ISO 11133 [Norma española experimental], 2015. Fuente: (UNE-EN ISO 11133-1, 2001).

5.3. Control de ambientes:

Mediante la técnica de sedimentación, se ubicaron cajas de PCA y YGC en la cabina y el cuarto de siembra durante 15 minutos, se llevó a incubar a 30 ± 1°C x 72 h y 25 ± 1°C x 5 días respectivamente.

5.4. Condiciones ambientales:

Se controlan las condiciones ambientales de temperatura y humedad, por medio de mediciones en Termohigrómetro Thomson 10050292.

5.5. Verificación del método de análisis microbiológico aplicado para la detección de *Salmonella* spp. sobre la matriz a base de agua Vaso Kola.

Siguiendo los lineamientos establecidos en la Resolución 1407:2022 (Tabla 1), en donde se establece para Helados a base de agua la detección del género *Salmonella* spp. (Ausencia/25g), se realiza la verificación de esta metodología sobre la matriz representativa Vaso Kola.

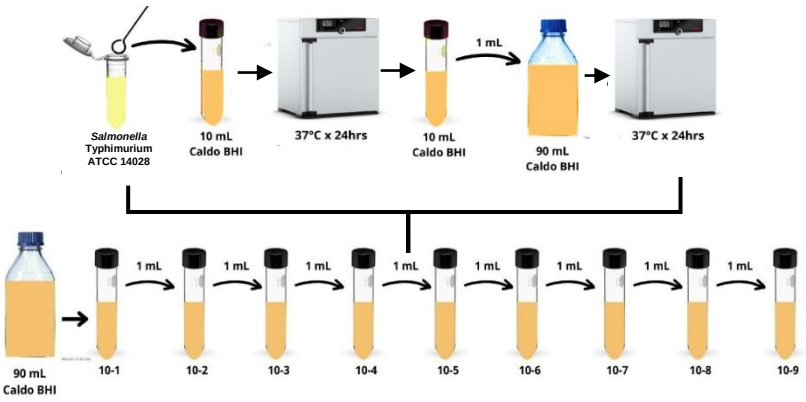
5.5.1. Estandarización de la cepa:

Se empleó como cepa de referencia la cepa comercial *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, conservada en el banco de microorganismos del laboratorio de calidad Crem Helado Meals S.A, planta floresta. Se inoculó el microrganismo en caldo Infusión cerebro corazón

(Brain heart infusion, BHI), y se incubó a 37°C x 24hrs. Pasado el periodo de incubación se transfirió un 1mL en 90ml de caldo BHI, se llevó a incubar siguiendo a las temperaturas mencionadas anteriormente. A partir de este cultivo se realizaron diluciones seriadas 1:10 en tubos estériles con 9ml de Agua de Peptona Tamponada 0,1 % hasta la dilución 10^{-9} (Figura 3), de las cuales se realizó siembras en profundidad por duplicado en agar Recuento en placa (Plate Count Agar, PCA), incubando a 37°C x 24hrs. El recuento de cada dilución proporcionó la concentración de referencia a utilizar.

Figura 3.

Esquema del método de estandarización de la cepa de referencia Salmonella Typhimurium *ATCC 14028 para el producto Vaso Kola.*



Nota: La figura representa la metodología aplicada en la estandarización de la cepa de referencia *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028

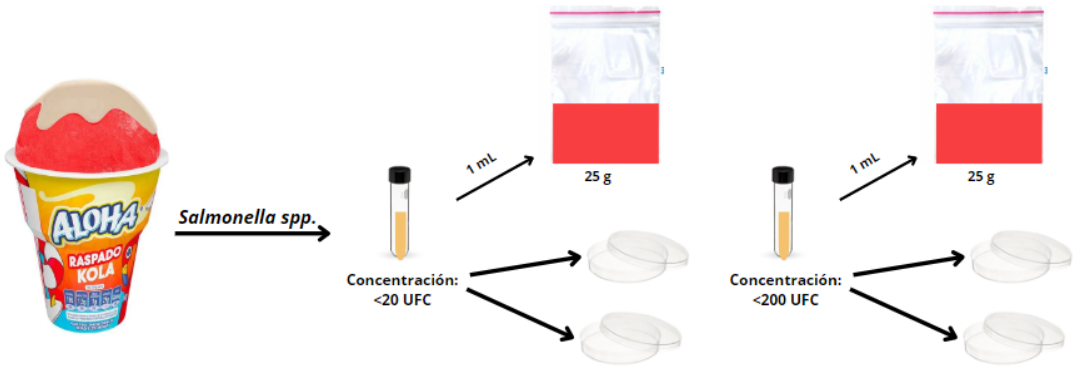
5.5.2. Inoculación de la muestra:

Bajo condiciones asépticas se realizó el procedimiento esquematizado en el Figura 4, en donde se pesaron 25 g a partir de 3 productos aleatorios de los 12 productos que comprenden la totalidad de cada lote de Vaso Kola en bolsas ziploc estériles, y mediante la adición de 1 mL de

la concentración conocida de la cepa de referencia se produjo artificialmente las inoculación de 10 lotes de producto, bajo dos rangos de inoculación; nivel bajo (0-20 UFC) determinando el límite de detección y nivel medio (<200 UFC) determinando el límite de cuantificación. Todos los inóculos fueron verificados por duplicado empleando la técnica de recuento en placa. Una vez se realizó la inoculación y homogenización, se procedió a realizar inmediatamente la técnica a verificar.

Figura 4.

Esquema del método de inoculación de los 10 lotes de Vaso Kola



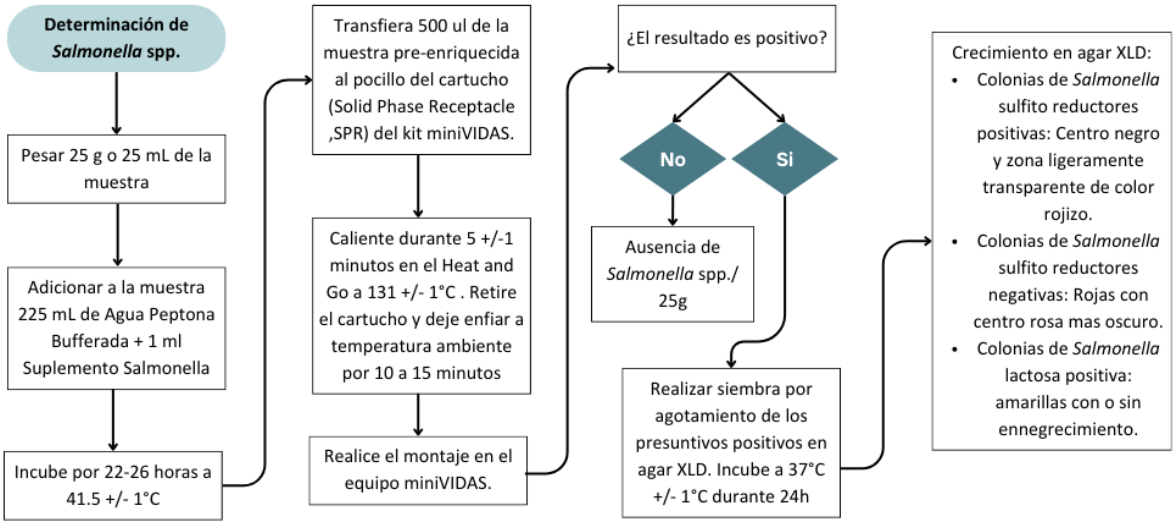
Nota: La figura ilustra la metodología de inoculación para los 10 lotes de la matriz Vaso Kola, bajo dos rangos: nivel bajo (0-20 UFC) y nivel medio (<200 UFC), confirmados por la técnica de recuento en placa en agar Recuento en placa (Plate Count Agar, PCA).

5.5.3. Aplicación de la metodología de detección:

Para llevar a cabo la verificación del método de determinación de *Salmonella* spp. (Presencia/Ausencia) basado en la norma AOAC 2013.01 (2013), se hizo uso de la cepa de referencia *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (Figura 5).

Figura 5.

Técnica de ensayo microbiológica aplicada al control de calidad del helado Vaso Kola



Nota: El diagrama describe las metodologías de ensayo microbiológico aplicadas en la Empresa CremHelado Meals SA para la determinación rápida de *Salmonella* spp. en el control de calidad de los productos terminados de tipo helado de agua Vaso Kola.

5.5.4. Procesamiento de las muestras:

En total se tomaron 15 lotes de la matriz Vaso Kola, de los cuales 10 fueron procesados con la cepa de referencia, y los 5 restantes se procesaron con ausencia de la inoculación de la cepa de referencia, siendo estos el blanco (control negativo), siendo procesados con todos los reactivos, condiciones y secuencias empleadas en el método de análisis sujeto a verificación. La

totalidad de los lotes fueron analizados por duplicado por medio de dos analistas diferentes, siguiendo el procedimiento operativo estándar descrito en la Figura 5. Los resultados obtenidos después de la lectura se registraron en una matriz de Excel para hacer las estimaciones estadísticas.

5.6. Verificación de los métodos de análisis microbiológico aplicados para la detección de Enterobacterias, *Staphylococcus* coagulasa positivo, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en el producto a base de crema Chococono.

Siguiendo los lineamientos establecidos en la Resolución 1407:2022, en donde se establece para Helados a base de crema la determinación de los parámetros Enterobacterias (10 UFC/ g o ml – 10^2 UFC/ g o ml), *Staphylococcus* coagulasa positivo (10^2 UFC/ g o ml – $2x10^2$ UFC/ g o ml), *Salmonella* spp. (Ausencia/25g), y *Listeria monocytogenes* (Ausencia/25g), se realizó la verificación de las metodologías aplicadas para la detección de estos microorganismos sobre la matriz representativa Chococono.

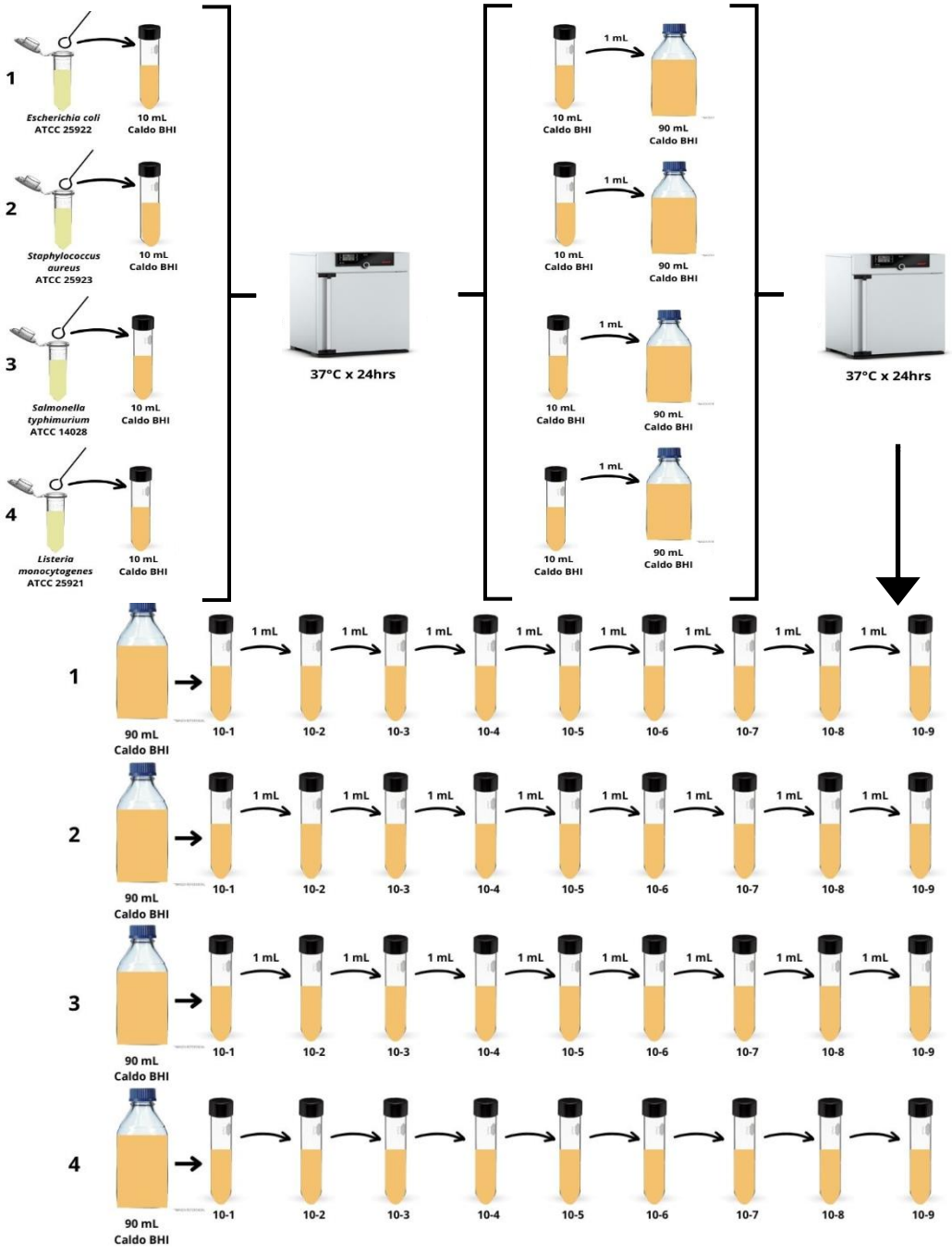
5.6.1. Estandarización de las cepas:

Se empleó como analitos de interés las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, y *Listeria monocytogenes* ATCC 25921, conservadas en el banco de microorganismos del laboratorio de calidad Meals S.A. Se inoculó cada microrganismo en caldo BHI, y se incubó a 37°C x 24hrs. Pasado el periodo de incubación se transfirió un 1mL en 90ml de caldo BHI, se llevó a incubar siguiendo a las temperaturas mencionadas anteriormente. A partir de estos cultivos se realizaron diluciones seriadas 1:10 en tubos estériles con 9ml de Agua de Peptona Tamponada 0,1 % hasta

la dilución 10^{-9} (Figura 6), de las cuales se realizó siembras en profundidad por duplicado en agar Recuento en placa (Plate Count Agar, PCA), incubando a 37°C x 24hrs. El recuento de cada dilución proporcionó la concentración de referencia a utilizar.

Figura 6.

Esquema del método de estandarización de las cepas de referencia para el producto Chococono



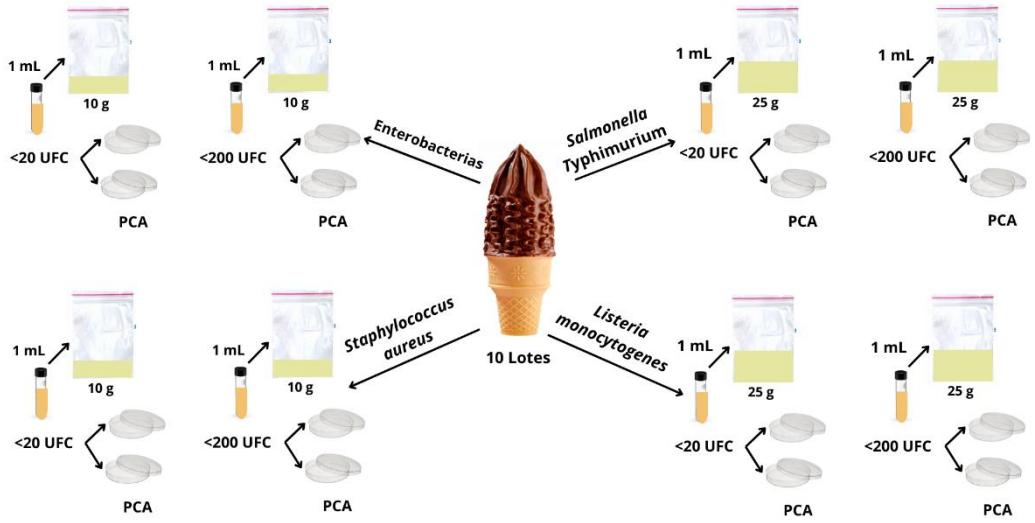
Nota: La figura representa la metodología aplicada en la estandarización de las cepas de interés microbiológico en el control de la calidad de la matriz Chococono (helado de crema). 1. Estandarización del inóculo de *Escherichia coli* ATCC 25922; 2. Estandarización del inóculo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; 3. Estandarización del inóculo de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028; 4. Estandarización del inóculo de *Listeria monocytogenes* ATCC 25921.

5.6.2. Inoculación de la muestra:

Bajo condiciones asépticas se realizó el procedimiento esquematizado en el Figura 7, se pesó 3 productos aleatorios de cada lote de Chococono, depositando 10 g para la detección de Enterobacterias - *Staphylococcus* coagulasa positivo, y 25 g para la determinación de *Salmonella* spp. - *Listeria monocytogenes* en bolsas ziploc estériles. Continuo a esto se realizó la inoculación de 1 mL de la concentración conocida las cepas de referencia, permitiendo la inoculación de 10 lotes de la matriz representativa, siguiendo dos rangos de inoculación; nivel bajo (0-20 UFC) y nivel medio (<200 UFC). Los inóculos se verificaron por duplicado empleando la técnica de recuento en placa en agar Recuento en placa (Plate Count Agar, PCA). Una vez realizada la inoculación y homogenización, se procedió a realizar inmediatamente la técnica a verificar.

Figura 7.

Esquema del método de inoculación de los 10 lotes de Chococono



Nota: La figura ilustra la metodología de inoculación para los 10 lotes de la matriz Chococono, bajo dos rangos de inoculación (nivel bajo (0-20 UFC); nivel medio (<200 UFC)), confirmados por la técnica de recuento en placa en agar Plate Count (PCA).

5.6.3. Aplicación de las metodologías de detección:

Para realizar la verificación del método de recuento en placa para Enterobacterias basado en la norma ISO 21528-1 (2017), se hizo uso de la cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922 (Figura 8. A)

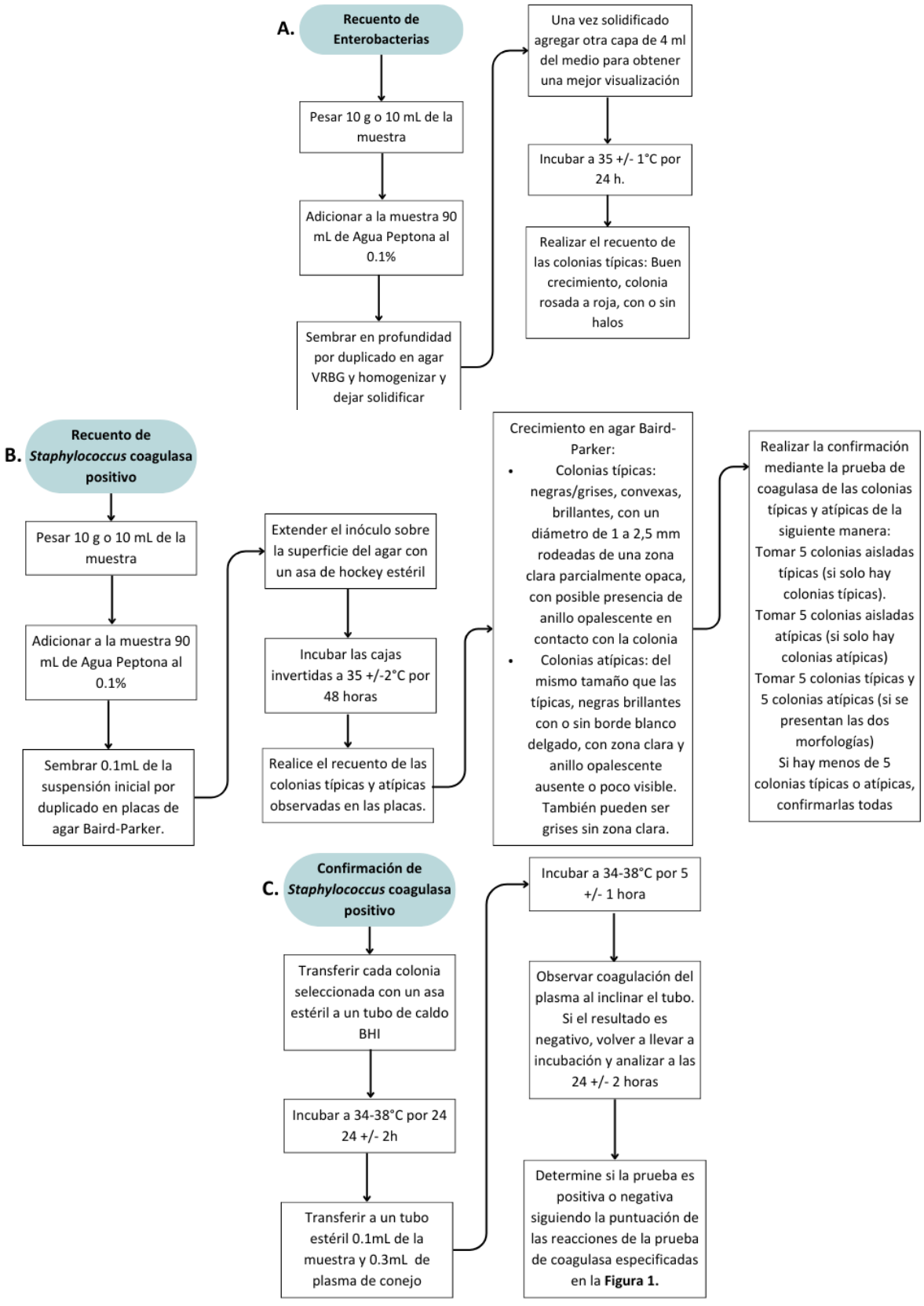
Para realizar la verificación del método de determinación de *Staphylococcus* coagulasa positivo basado en la norma ISO 6888-1 (2021), se hizo uso de la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Figura 8. B - C).

Para llevar a cabo la verificación del método de determinación de *Salmonella* spp. (Presencia/Ausencia) basado en la norma AOAC 2013.01 (2013), se hizo uso de la cepa de referencia *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. (Figura 8. D).

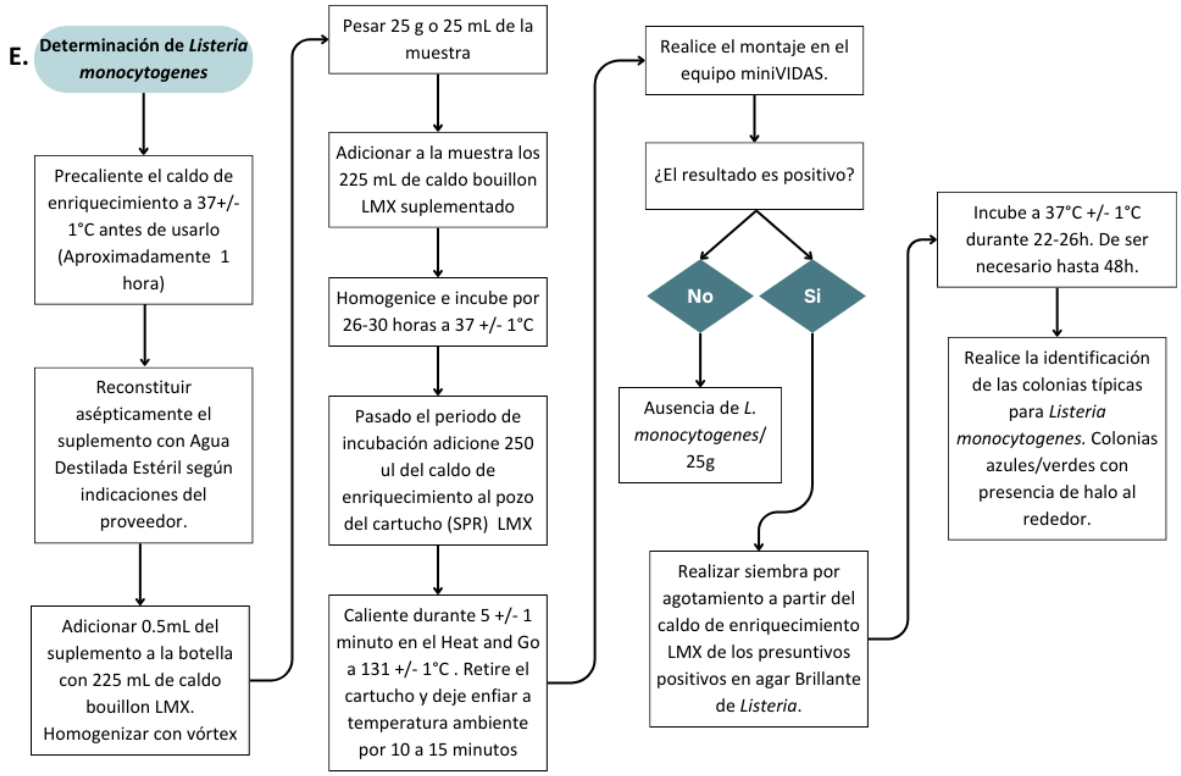
Para realizar la verificación del método de determinación de *Listeria monocytogenes* basado en la norma AOAC 2013.11 (2013), se hizo uso de la cepa de referencia *Listeria monocytogenes* ATCC 25921(Figura 8. E).

Figura 8.

Técnicas de ensayo microbiológicas aplicadas para control de calidad del helado Chococono



D. Ver Figura 5.



Nota: El diagrama describe las metodologías de ensayo microbiológico aplicadas en la Empresa CremHelado Meals SA para el control de calidad de los productos terminados del helado de crema Chococono. A. Método de recuento en placa para la detección y cuantificación de Enterobacterias B. Método de determinación de *Staphylococcus* coagulasa positivo C. Confirmación de *Staphylococcus* coagulasa positivo Método de determinación de actividad coagulasa. D. Método de determinación rápida de *Salmonella* spp. (Figura5). E. Método de determinación rápida de *Listeria monocytogenes*

5.6.4. Procesamiento de las muestras:

En total se tomaron 15 lotes de la matriz Chococono, de los cuales 10 fueron procesados con la cepa de referencia, y los 5 restantes se procesaron con ausencia de la inoculación de la cepa de referencia, siendo estos el blanco (control negativo), siendo procesados con todos los reactivos, condiciones y secuencias empleadas en el método de análisis sujeto a verificación. La totalidad de los lotes fueron analizados por duplicado por medio de dos analistas diferentes, siguiendo los procedimientos operativos estándar descrito en la Figura 8. Los resultados obtenidos después de la lectura se registraron en una matriz de Excel para hacer las estimaciones estadísticas.

5.7. Parámetros de desempeño y criterios de aceptación

5.7.1. Métodos cualitativos

El análisis estadístico de tipo cualitativo permite identificar los parámetros de desempeño de los datos que no son expresados numéricamente, los cuales son establecidos para microorganismos patógenos que representan un alto riesgo para la salud humana incluso en pequeñas cantidades por lo que, se requiere de un control riguroso enfocado en la cero tolerancia de su presencia en alimentos destinados para el consumo humano. Ejemplo de estos es la determinación de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes,* a los cuales los requisitos reglamentarios para el control de calidad de alimentos destinados para el consumo humano establecen su ausencia obligatoria (Ministerio de Salud y Protección Social, Resolución 1407, 2022, pág. 15).

5.7.1.1. Límites de detección:

Se determinó si el método es capaz de recuperar < 20 UFC/mL en un mínimo de 80% de las repeticiones (CCAYAC-CR-018, 2016). Para las muestras inoculadas se procedió como se indica en el método de prueba. Se registraron los resultados como ausencia y presencia y se hizo uso de la siguiente formula:

$$LD = \frac{VP}{Ni}\ x\ 100$$

Ecuación 1. Límite de detección.

Nota: LD: Limite de detección; VP: Verdaderos Positivos de muestras inoculadas; Ni: Número total de muestras inoculadas. Tomado de la Guía de Validación de Métodos Microbiológicos MEC-PR-GVM 2022.06 (CNRPyC, 2022)

5.7.1.2. Selectividad:

Las dos analistas realizaron diferentes repeticiones, inoculando los siguientes controles:

a. Falsos positivos:

Para realizar la verificación de los falsos positivos, las muestras se inocularon con >100 UFC/mL del microorganismo interferente (control negativo) (CCAYAC-CR-018, 2016).

b. Falsos negativos:

Para la verificación de los falsos negativos las muestras se inocularon <20 UFC/mL del microorganismo de interés (control positivo) (CCAYAC-CR-018, 2016).

5.7.1.3.Sensibilidad y Especificidad:

Se aplica la tabla de contingencia de 2 x 2, en donde se ubican los datos de la siguiente manera (Instituto Nacional de Salud [INS] POE-R01.0000-014, 2022):

A. **Verdaderos positivos:** Muestras inoculadas con la cepa de referencia que al aplicarles el test dan un resultado positivo.
B. **Falsos positivos:** Muestras negativas (sin inocular o con ausencia de la cepa de referencia) que al aplicarles el test dan un resultado positivo.
C. **Falsos negativos:** Muestras inoculadas con la cepa de referencia que al aplicarles el test dan un resultado negativo.
D. **Verdaderos negativos:** Muestras negativas (sin inocular o con ausencia de la cepa de referencia) que al aplicarles el test dan un resultado negativo.

Una vez diligenciada la tabla de 2 x 2 se hace uso de las siguientes formulas:

$$Sensibilidad: \frac{A}{A+C}\ X\ 100$$

Ecuación 2. Sensibilidad

$$Especificidad: \frac{D}{B+D}\ X\ 100$$

Ecuación 3. Especificidad

5.7.1.4. Incertidumbre:

Se mencionan las fuentes de incertidumbre asociadas a las mediciones (CCAYAC-CR-018, 2016):

- Distribución de los microorganismos en la muestra.
- Personal operativo.
- Mediciones (pesada o medición de la muestra).
- Homogenización, diluciones.
- Calidad de los medios.
- Tiempo hasta la inoculación.
- Temperatura de incubación.

5.7.2. Métodos cuantitativos

El análisis estadístico cuantitativo permite identificar los parámetros de desempeño de los datos de tipo numérico por medio de modelos estadísticos, los cuales son establecidos para microorganismos que requieren una cuantificación siguiendo los requerimientos establecidos por las normativas de control de calidad y seguridad alimentaria. Ejemplo de esto es la detección y cuantificación de Enterobacterias y *Staphylococcus* coagulasa positivo por medio del método de recuento en placa estandarizado, brindando consistencia en la evaluación de la calidad microbiológica de diversas matrices, entre esas la alimentaria.

5.7.2.1. Repetibilidad:

Un solo analista bajo las mismas condiciones en intervalos cortos de tiempo realizó diferentes repeticiones inoculando < 20 UFC (Inoculación baja) y <200 (Inoculación media), permitiendo determinar el grado de concordancia entre los resultados obtenidos, con un criterio de aceptación de r <3 (CCAYAC-CR-018, 2016), haciendo uso de la siguiente formula:

$$r = 2.8 \cdot \sqrt{\frac{DSR^2}{n}}$$

Ecuación 4. Repetibilidad

Donde,

2.8 = Factor de relación con el 95% de confianza.

DSR = Desviación estándar relativa

n = Número de repeticiones

5.7.2.2. Reproducibilidad:

Las dos analistas realizaron repeticiones con < 20 UFC (Inoculación baja) y <200 (Inoculación media), permitiendo determinar el grado de concordancia entre los resultados obtenidos bajo diferentes analistas dentro de las mismas condiciones, con un criterio de aceptación de r <3 (CCAYAC-CR-018, 2016), siguiendo la siguiente formula:

$$R = 2.8 \cdot \sqrt{\frac{DSR_1{}^2 + DSR_2{}^2}{n}}$$

Ecuación 5. Reproducibilidad

Donde,

2.8 = Factor de relación con el 95% de confianza.

DSR_1 = Desviación estándar relativa del analista 1

DSR_2 = Desviación estándar relativa del analista 2

n = Número de repeticiones

5.7.2.3. Recuperación:

Se determina la cantidad de UFC que el método de prueba es capaz de recuperar al inocular un numero conocido de microorganismos (CCAYAC-CR-018, 2016), por medio de la siguiente formula:

$$\%Recuperación: \frac{Media\ de\ los \log de\ las\ cuentas}{Log\ de\ las\ UFC\ inoculadas} x100$$

Ecuación 6. Recuperación

5.7.2.4. Sesgo:

Se calculó el valor absoluto entre la diferencia del logaritmo del inóculo utilizado menos los logaritmos de las UFC recuperadas experimentalmente, con un criterio de aceptación de < 0.3 log (CCAYAC-CR-018, 2016), siguiendo la siguiente formula:

$$\%Sesgo: \left| Ve - Vo \right|$$

Ecuación 7. Sesgo

Donde,

Ve= Valor esperado

Vo= Valor obtenido

5.7.2.5. Incertidumbre:

A partir de las diferentes repeticiones realizadas por los dos analistas, se determinan los logaritmos de los resultados obtenidos (CCAYAC-CR-018, 2016). Se procede según la siguiente ecuación:

$$SR = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\frac{(yiA - yiB)^2}{2}}$$

Ecuación 8. Incertidumbre SR

Donde,

yiA y yiB = Datos transformados a log 10 (UFC/mL)

Con el valor de SR, se procede a calcular la incertidumbre expandida (U) (CCAYAC-CR-018, 2016), siguiendo la siguiente formula:

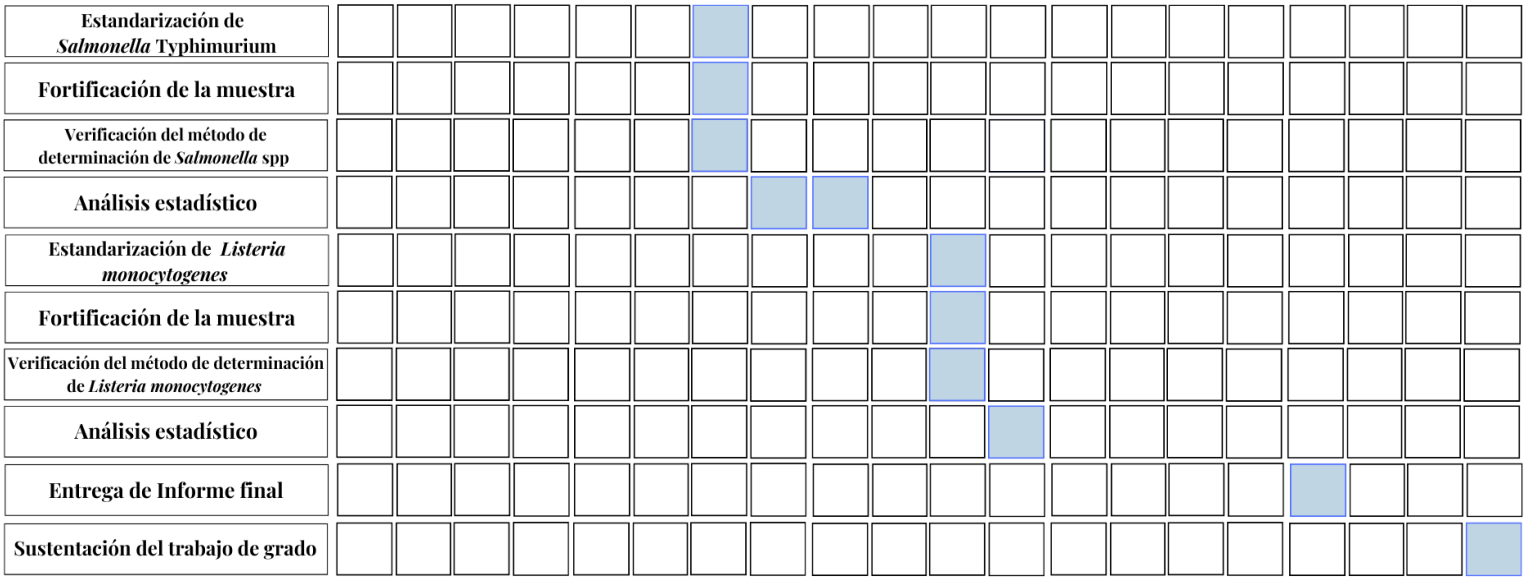
$$U: 2\ x\ SR$$

Ecuación 9. Incertidumbre expandida (U)

6. CRONOGRAMA

Actividad / Semana	Agosto				Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Revisión y modificación plan de muestreo de alérgenos																				
Cronograma semanal de alérgenos por línea de producción																				
Inventario mensual de Kits de detección de alérgenos																				
Desarrollo y actualización de herramienta de análisis estadístico de resultados de detección de alérgenos																				
Capacitación sobre Plan de monitoreo alérgenos a practicantes y analistas fisicoquímicos.																				
Revisión bibliográfica métodos de ensayo y validaciones microbiológicas.																				
Selección de lotes representativos																				
Validez del método de análisis microbiológico para la detección de *Salmonella* spp. en la matriz a base de agua Vaso Kola.																				
Estandarización de *Salmonella* Typhimurium																				
Fortificación de la muestra																				
Verificación del método de determinación de *Salmonella* spp																				
Análisis estadístico																				
Continuidad al proceso de vida útil en tiempo real de diferentes referencias.																				
Validación efectividad de desinfectantes (concentraciones usadas en planta)																				
Ajuste del método de retroalimentación de manipuladores con novedad de recuento																				

Actividad / Semana	Octubre				Noviembre				Diciembre				Enero				Febrero			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Revisión bibliográfica																				
Efectividad de los métodos de análisis microbiológico aplicados para la detección de Enterobacterias, *Staphylococcus* coagulasa positiva, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en el producto a base de crema Chococono																				
Estandarización de *Escherichia coli*																				
Fortificación de la muestra																				
Verificación del método de recuento en placa para Enterobacterias																				
Análisis estadístico																				
Estandarización de *Staphylococcus aureus*																				
Fortificación de la muestra																				
Verificación del método de determinación de *Staphylococcus* coagulasa positiva																				
Análisis estadístico																				


Estandarización de *Salmonella* Typhimurium
Fortificación de la muestra
Verificación del método de determinación de *Salmonella* spp
Análisis estadístico
Estandarización de *Listeria monocytogenes*
Fortificación de la muestra
Verificación del método de determinación de *Listeria monocytogenes*
Análisis estadístico
Entrega de Informe final
Sustentación del trabajo de grado

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Verificación de variables pre-análisis

En Ministerio de Salud y Protección social, por medio de la Resolución 1407 de 2022 establece para helados en base de agua el análisis microbiológico de *Salmonella* spp. (Ausencia/25g), y para helados en base de leche el análisis de Enterobacterias (m: 10 UFC/g y un índice máximo permisible para identificar un nivel aceptable de calidad (M): 10^2 UFC/g), *Staphylococcus* coagulasa positivo (m: 10^2 UFC/ g o ml – M: $2x10^2$ UFC/ g o ml), *Salmonella* spp. (Ausencia/25g), y *Listeria monocytogenes* (Ausencia/25g). A partir de esta información se eligió como matriz representativa con alcance en la metodología para helados en base de agua el producto Vaso Kola, y para la metodología de helados en base de leche el producto Chococono, fabricado en las instalaciones de la planta floresta Crem Helado Meals S.A. Una vez obtenidos los 15 lotes de cada producto (Tabla 5), se procedió a determinar su microbiota, encontrándose en cumpliendo con los requerimientos microbiológicos determinados por la mencionada Resolución 1407: 2022 (Resolución 1407, 2022, pág. 15).

Tabla 5.

Matriz de estudio.

Chococono	**Análisis microbiológico**				**Vaso Kola**	**Análisis microbiológico**
Lote	Enterobacterias	*Staphylococcus* coagulasa positiva	*Salmonella* spp.	*Listeria monocytogenes*	**Lote**	*Salmonella* spp.
R5448068	<10 UFC/g	<100 UFC/g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	R5448069	Ausencia/25g
N5449242	<10 UFC/g	<100 UFC/g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	N5451264	Ausencia/25g
N5441268	<10 UFC/g	<100 UFC/g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	N54499243	Ausencia/25g
N5453853	<10 UFC/g	<100 UFC/g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	N5453854	Ausencia/25g
N005453981	<10 UFC/g	<100 UFC/g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	N5453982	Ausencia/25g
N5455608	<10 UFC/g	<100 UFC/g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	N5455609	Ausencia/25g
N005456855	<10 UFC/g	<100 UFC/g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	N5457280	Ausencia/25g
N5458969	<10 UFC/g	<100 UFC/g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	N5458970	Ausencia/25g
N5458968	<10 UFC/g	<100 UFC/g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	N5462607	Ausencia/25g
N5460771	<10 UFC/g	<100 UFC/g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	N5463114	Ausencia/25g
N5469770	<10 UFC/g	<100 UFC/g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	N5465553	Ausencia/25g
N5463113	<10 UFC/g	<100 UFC/g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	N5466720	Ausencia/25g
N005510449	<10 UFC/g	<100 UFC/g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	N5468933	Ausencia/25g
N5513624	<10 UFC/g	<100 UFC/g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	N5470552	Ausencia/25g
N5513876	<10 UFC/g	<100 UFC/g	Ausencia/25g	Ausencia/25g	N5484855	Ausencia/25g

En los medios de cultivo sólidos se realizó verificación de pH, control de esterilidad, productividad y selectividad por medio de análisis ecométrico. Para medios líquidos se realizó el método cualitativo (turbidez) en un solo tubo. Los resultados obtenidos se relacionan en la Tabla 6.

Tabla 6.

Características de pH, esterilidad, productividad y selectividad de los medios de cultivo utilizados.

Medio	pH	Esterilidad	Productividad	Selectividad
Agar PCA (Recuento en placa)	7.0	0 UFC	Inóculo: *S. aureus* Incubación: 30 ± 1°C x 24h Índice crecimiento G1: 15	No aplica
Agar YGC (extracto de levadura, glucosa, cloranfenicol)	6.6	0 UFC	Inóculo: *S cerevisiae* Incubación: 25 ± 1°C x 24h Índice crecimiento G1: 13	Inóculo: *E. coli* Incubación: 25 ± 1°C x 24h Índice crecimiento G1: 0
Agar VRBG (Violeta rojo y bilis glucosa)	7.4	0 UFC	Inóculo: *E. coli* Incubación: 35 ± 1°C x 24h Índice crecimiento G1: 14	Inóculo: *S. aureus* Incubación: 35 ± 1°C x 24h Índice crecimiento G1: 0
Agar Baird Parker	6.8	0 UFC	Inóculo: *S. aureus* Incubación: 35 ± 1°C x 24h Índice crecimiento G1: 14	Inóculo: *E. coli* Incubación: 35 ± 1°C x 24h Índice crecimiento G1: 0
Agar XLD (Xilosa lisina desoxicolato)	7.2	0 UFC	Inóculo: *S.* Typhimurium Incubación: 37 ± 1°C x 24h Índice crecimiento G1: 16	Inóculo: *E. coli* Incubación: 37 ± 1°C x 24h Índice crecimiento G1: 3
Agar brillante *Listeria*	7.2	0 UFC	Inóculo: *L. monocytogenes* Incubación: 37 ± 1°C x 24h Índice crecimiento G1: 14	Inóculo: *E. coli* Incubación: 37 ± 1°C x 24h Índice crecimiento G1: 0
Agua Peptonada Bufferada + suplemento *Salmonella*	7.1	Ausencia	Inóculo: *S.* Typhimurium Incubación: 41 ± 1°C x 24h Crecimiento: turbidez, con viraje del caldo de azul a amarillo.	Inóculo: *E. coli* Incubación: 41 ± 1°C x 24h Crecimiento: Sin turbidez, sin viraje, caldo color azul.
Caldo Bouillon LMX + suplemento	6.7	Ausencia	Inóculo: *L. monocytogenes* Incubación: 37 ± 1°C x 24h Crecimiento: turbidez.	Inóculo: *E. coli.* Incubación: 37 ± 1°C x 24h Crecimiento: Sin turbidez
Agua Peptonada 0.1 % (Peptona, Cloruro de sodio)	6.8	Ausencia	Inóculo: *E. coli, S. aureus, S.* Typhimurium y *L. monocytogenes* Incubación: 37 ± 1°C x 24h Crecimiento: turbidez	No aplica
Caldo BHI (Infusión cerebro corazón)	7.0	Ausencia	Inóculo: *E. coli, S. aureus, S.* Typhimurium y *L. monocytogenes* Incubación: 37 ± 1°C x 24h Crecimiento: turbidez	No aplica

Teniendo en cuenta los resultados agrupados en la Tabla 6, se ha establecido que los medios de cultivo utilizados en este estudio estuvieron dentro de los parámetros establecidos por cada casa comercial siendo aptos para uso. Todos mostraron condiciones de esterilidad que brindaron seguridad sobre la ausencia de microorganismos interferentes. El medio PC para la detección de aerobios mesófilos con el inóculo de *S. aureus* presentó un índice de crecimiento G1 de 15, el medio YGC empleado para la detección de mohos y levaduras con el inóculo de *S cerevisiae* presento un índice de crecimiento G1 de 13, y con el inóculo de *E. coli* no presentó crecimiento, debido a la actividad antimicrobiana del Cloranfenicol (Merck Millipore, 2012). El medio de cultivo VRBG selectivos de bacilos Gram negativos, permiten el aislamiento de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* presentes en alimentos, por lo que haciendo uso del inóculo *E. coli* dio como resultado un índice de crecimiento G1 de 14, y con el microrganismo interferente *S. aureus* no presentó crecimiento, esto debido a que el medio VRBG contiene sales biliares y cristal violeta que inhiben el desarrollo de bacterias gram positivas. (Thermo Scientific, s.f.). El medio de cultivo Baird Parker es un medio selectivo para el aislamiento y cuantificación de estafilococos coagulasa positivos en alimentos, por lo que haciendo uso del inóculo *S. aureus* dio como resultado un índice de crecimiento G1 de 14, y con el microrganismo interferente *E. coli* no presento crecimiento siendo inhibido por los agentes selectivos cloruro de litio y telurito, que son tóxicos para la mayoría de especies gram negativas (Thermo Fisher, s.f.). El agar XLD para el aislamiento selectivo y diferencial de enterobacterias según fermentación de la xilosa y degradación de la lisina, presento un índice crecimiento G1 de 16 con el inóculo de *S.* Typhimurium, y con el microorganismo interferente *E. coli* presentó un G1 de 3, debido a que este medio permite el desarrollo de otras enterobacterias diferentes a *Salmonella* spp., pero con

características diferenciales como cambios de pH según fermentación de azucares, producción H_2S, y descarboxilación de la lisina, permitiendo la diferenciación de estos microorganismos, siendo colonias amarillas y opacas con crecimiento moderado para el inóculo de *E.coli* y un buen desarrollo de colonias rojas con centro negro, crecimiento característico de *Salmonella* spp. (Thermo Scientific, s.f.). El agar brillante *Listeria* con el inóculo de *L. monocytogenes,* obtuvo un índice crecimiento G1 de 14, y con el inóculo interferente de *E. coli* un G1 de 0, esto debido a que contiene los agentes selectivos cloruro de litio, polimixina B y ácido nalidíxico, que producen su inhibición (Thermo Scientific, 2023). El Agua Peptonada Bufferada + suplemento *Salmonella*, presento su viraje característico para la presencia de *Salmonella* spp., de azul a amarillo, y con el inóculo interferente *E. coli* no mostro cambio en el medio. El caldo Bouillon LMX + suplemento presentan turbidez con el inóculo de *L.monocytogenes* a partir de su composición rica en peptonas con características amortiguadoras manteniendo el pH en condiciones cercanas al neutro, permitiendo el óptimo desarrollo este microorganismo y con el inóculo *E.coli* no presentó crecimiento, esto debido a que el caldo Bouillon LMX combinado con el suplemento liofilizado LMX brindan una alta selectividad inhibiendo las bacterias gram negativas por sus componentes cloruro de litio, acriflavina, ácido nalidíxico, y antibióticos presentes en el suplemento (bioMérieux , 2014). El Agua Peptonada 0.1 % y el caldo BHI presentaron turbidez con los inóculos de *E. coli, S. aureus, S.* Typhimurium *y L. monocytogenes*.

Se establece en la norma UNE-EN-ISO 11133-1 (2001), que el índice de crecimiento GI obtenido por una cepa objetivo o diana debe ser típico y como mínimo 6 para que se establezca que el medio es aceptable, y por el contrario las cepas no objetivo deben ser parcial o completamente inhibidos, por lo que, se establece que los medios solidos cumplen con las

características de productividad, ya que todos tuvieron valor de crecimiento G1 >6, y selectividad, al inhibir a los microorganismos interferentes, o en el caso del medio XLD inhibirlo parcialmente. Todos los medios líquidos evidenciaron turbidez con los microorganismos diana, presentando alta productividad. El medio liquido selectivo Agua Peptona Bufferada + suplemento *Salmonella* y el caldo Bouillon LMX + suplemento presentaron una adecuada selectividad, al no permitir el desarrollo de *E. coli.*

Se realizó un control de ambientes mediante la técnica de sedimentación, ubicando cajas de PCA y YGC en la cabina de flujo laminar y el cuarto de siembra durante 15 minutos, e incubando a 30 ± 1 °C por 3 días y 25 ± 1°C por 5 días respectivamente. Los resultados obtenidos se relacionan en la Tabla 7, en donde se evidencia que los ambientes utilizados para el desarrollo de este estudio presentaron condiciones adecuadas de esterilidad minimizando interferencias.

Tabla 7.

Características del control microbiológico de ambientes.

Área	Mesófilos aerobios	Mohos	Levaduras
Cabina de Flujo	<10 UFC/ 60cm^2/15min	<10 UFC/ 60cm^2/15min	<10 UFC/ 60cm^2/15min
Área siembra	<10 UFC/ 60cm^2/15min	<10 UFC/ 60cm^2/15min	<10 UFC/ 60cm^2/15min

Nota: Resultados obtenidos del control de ambientes por medio de la técnica de sedimentación en las áreas de ejecución de este estudio.

Se determinaron las condiciones ambientales de temperatura y humedad, por medio de mediciones en Termohigrómetro Thomson 10050292. Las condiciones durante el montaje de la prueba fueron: **Temperatura**: 25°C; **Humedad**: 42%.

7.2. Helados de Agua

7.2.1. Estandarización de cepas

Del cultivo de *Salmonella* Typhimurium se procedió a realizar diluciones seriadas hasta 10^{-9}, sembrando en profundidad en agar PCA por duplicado desde la dilución 10^{-6} hasta 10^{-9}. Pasado el periodo de incubación se determinaron las diluciones a utilizar para la realización de este estudio, especificadas en la Tabla 8.

Tabla 8.

Inoculación media y baja aplicada a la matriz Vaso Kola.

Microorganismo	Dilución utilizada	Recuento
Salmonella Typhimurium ATCC 14028	Inoculación baja -> Dilución 10^{-8}: 17 – 15 colonias	1,6 x10^{9} UFC / ml
	Inoculación media -> Dilución 10^{-7}: 140 - 126 colonias	1,3 x10^{9} UFC / ml

Nota: Recuento en placa en agar PCA de las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} para *S.* Typhimurium ATCC 14028

7.2.2. *Salmonella* spp. (*Salmonella* Typhimurium)

Cada analista aplico las inoculaciones establecidas en la Tabla 8 para *S.* Typhimurium en 10 lotes seleccionados del helado Vaso Kola, los que se incubaron en su medio de

enriquecimiento. Continuó a esto cada analista realizó la metodología de detección de *Salmonella* spp. establecida en la AOAC 2013.01 (2013), haciendo uso del instrumento automatizado mini VIDAS, los datos de los resultados obtenidos se registraron en una hoja de cálculo referenciada en el anexo 2.

A partir de los datos obtenidos se procedió a determinar los parámetros de desempeño, dando como resultado los datos referenciados en la Tabla 9, iniciando por el límite de detección, en donde se establece que el método de verificación es capaz de recuperar una inoculación baja de microorganismos en el 100% de las muestras inoculación con <20 UFC/ml de la matriz Vaso Kola, cumpliendo con el criterio de límite de detección.

Tabla 9.

Resultados estadísticos de la verificación del método de detección para Salmonella spp. *en la matriz Vaso Kola*

Analistas	**Límite detección**	**Limite selectividad**		**Sensibilidad**	**Especificidad**
		Falso negativo	**Falso positivo**		
Analista 1 y 2	100%	100%	60%	100%	100%

Al determinar el límite de selectividad, cada analista realizó 5 repeticiones con la matriz Vaso Kola inoculada con >100 UFC/mL del microorganismo control negativo *E.coli,* y analizarlas bajo la metodología empleada para la detección de *Salmonella* spp., por medio del equipo mini VIDAS, se obtuvieron los resultados agrupados en la Tabla 9, presentando un porcentaje del 60% en la detección del microorganismo interferente, arrojando resultados de tipo falso positivos, a los que continuamente se les realizo siembra en superficie en el agar XLD,

generando siendo este el crecimiento característico de *E. coli*, por lo que se descarta que las muestras correspondan a pruebas positivas, resultado que respalda el uso de la metodología complementaria de detección en medio de cultivo sólido, ya que, por medio de la identificación morfología se puede minimizar el riesgo de detectar falsos positivos, dando más robustez al método de detección, permitiendo así obtener resultados más confiables. También se rectificó de nuevo las 5 muestras de cada analista en el equipo mini VIDAS, realizando una homogenización más exhaustiva y un control de tiempos más estrictos, minimizando riesgos de interferencias no especificadas que puedan afectar la producción de la fluorescencia, emitiendo señales equivocas que son detectadas por el escáner óptico del equipo. Al obtener los resultados se evidenció que las muestras eran negativas, lo que señala la rigurosidad con la que se debe realizar este procedimiento, para obtener resultados confiables.

Como complemento, se determinó el porcentaje de selectividad respecto a los falsos negativos, a partir de las muestras inoculadas con < 20 UFC/mL del microorganismo control positivo *S.* Typhimurium, y analizadas bajo la metodología empleada para la detección de *Salmonella* spp. por medio del equipo mini VIDAS, obteniendo los resultados agrupados en la Tabla 9, en donde se puede evidenciar que se presenta un cumplimiento del 100% en la detección del microorganismo de interés, por lo que, no se arrojaron resultados de tipo falso negativos, otorgando confiabilidad en el método de detección, ya que no se presentaron interferencias que evitaran la unión antígeno-anticuerpo, otorgando una adecuada señal de detección del microorganismo de interés. A su vez, al realizar la siembra en medio solido XLD, se pudo obtener un buen desarrollo, con colonias rojas con centro negro, características de

Salmonella spp., evidenciando que el medio de cultivo utilizado es adecuado para la detección del género *Salmonella*.

Al verificar la probabilidad de que la metodología permita la adecuada detección de *Salmonella* spp. en muestras que efectivamente están inoculadas con *S.* Typhimurium, se evidenciaron los resultados mencionados en la Tabla 9, donde se obtuvo una sensibilidad del 100% en ambas inoculaciones, indicando que todas las muestras inoculadas con la cepa de referencia presentaron resultados Positivos, respaldando la veracidad de los datos proporcionados por el kit mini VIDAS, en la detección de *Salmonella* spp. En paralelo se determinó el porcentaje de especificidad proporcionado por el método de detección, por medio de los 5 lotes seleccionados como muestras blanco (sin carga microbiana), dando como resultado un 100% en la probabilidad de que la prueba identifique como negativa las muestras que no fueron inoculadas, lo que nos indica que el método es altamente especifico en muestras que no contienen la presencia de enterobacterias.

Dentro de las fuentes de incertidumbre asociadas a las mediciones se puede encontrar: uniformidad de la distribución de los microorganismos en la muestra, exactitud de los equipos utilizados, condiciones de tiempo, incubación y, homogenización.

7.3. Helados de crema

7.3.1. Estandarización de cepas

De los cultivos de *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella* Typhimurium y *Listeria monocytogenes* se procedió a realizar diluciones seriadas hasta 10^{-9}, sembrando en profundidad en agar PCA por duplicado desde la dilución 10^{-6} hasta 10^{-9}. Pasado el periodo de

incubación se determinaron las diluciones a utilizar para la realización de este estudio, especificadas en la Tabla 10.

Tabla 10.

Inoculación media y baja aplicada a la matriz Chococono.

Microorganismo	Dilución utilizada	Recuento
Escherichia coli ATCC 25922	Inoculación baja - > Dilución 10^{-8}: 22 – 20 colonias	$2{,}1x10^{9}$ UFC / ml
	Inoculación media -> Dilución 10^{-7}: 148 - 135 colonias	$1{,}4x10^{9}$ UFC / ml
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Inoculación baja - > Dilución 10^{-8}: 10 – 12 colonias	$1{,}1x10^{10}$ UFC / ml
	Inoculación media -> Dilución 10^{-7}: 99 + 105 colonias	$1{,}0\ x10^{10}$ UFC / ml
Salmonella Typhimurium ATCC 14028	Inoculación baja -> Dilución 10^{-8}: 17 – 15 colonias	$1{,}6\ x10^{9}$ UFC / ml
	Inoculación media -> Dilución 10^{-7}: 140 + 126 colonias	$1{,}3\ x10^{9}$ UFC / ml
Listeria monocytogenes ATCC 25921	Inoculación baja -> Dilución 10^{-8}: 9 – 7 colonias	$8{,}0\ x10^{8}$ UFC / ml
	Inoculación media -> Dilución 10^{-7}: 155 + 167 colonias	$1{,}6\ x10^{8}$ UFC / ml

Nota: Recuento en placa en agar PCA de las diluciones 10^{-7} y 10^{-8}, para los microorganismos *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S.* Typhimurium ATCC 14028 y *Listeria monocytogenes* ATCC 25921

7.3.2. Enterobacterias

Se empleo la matriz Chococono a los que se les aplicó las inoculaciones establecidas en la Tabla 10 para *E. coli.* Cada analista realizó la siembra en profundidad en agar VRBG de los 10 lotes bajo los dos rangos de inoculación, y los 5 lotes sin presencia de inóculo. Pasado el periodo de incubación, se realizó el recuento de las UFC, registrados en la hoja de cálculo Anexo 1.

Se determinaron los parámetros de desempeño, dando como resultado los datos referenciados en la Tabla 11, iniciando por el grado de Repetibilidad (r), en donde se establece un nivel de concordancia significativa en los resultados analíticos individuales obtenidos por cada analista bajo cada nivel de inoculación, presentando un nivel de aceptación de r<3, permitiendo suponer que al repetir la metodología aplicada se pueden conseguir resultados confiables y consistentes (CCAYAC- CR-018, 2016).

Tabla 11.

Resultados estadísticos de la verificación del método de recuento en placa de Enterobacterias *en la matriz Chococono*

	Matriz Chococono		**Repetibilidad (r)**	**Reproductibilidad (R)**	**% Recuperación**	**Sesgo**	**Incertidumbre expandida (U)**
VRBG	Analista 1	Inoculación baja	0,0060558	0,0081885	103,1403895	0,2927539	0,1521846
	Analista 2		0,0098707		102,5796091	0,2404768	
	Analista 1	Inoculación media	0,0047489	0,0051764	101,8404286	0,1684131	0,0888459
	Analista 2		0,0055712		101,8785627	0,1719027	

En análisis estadístico de Reproductibilidad (R) evidenciado en la Tabla 11 establece un nivel de reproductibilidad aceptable con resultados R<3, permitiendo determinar que los datos analíticos obtenidos por las dos analistas, bajo las mismas condiciones presentan un alto nivel de concordancia y de repetibilidad, indicando que metodología utilizada puede ser reproducida por otros analistas, obteniendo resultados estadísticos significativos (CCAYAC- CR-018, 2016).

Se determino el % de Recuperación del método de prueba descrito en la Tabla 11, a partir de los datos obtenidos por cada analista, permitiendo identificar que los resultados obtenidos por las dos analistas, bajo los dos niveles de inoculación en el medio VRBG se encuentran acordes al % de recuperación establecido (90-120%), lo que permite determinar una recuperación optima de

los microorganismos inoculados, evidenciando una correcta homogenización de la muestra, y por ende una recuperación satisfactoria de los microorganismos inoculados (CCAYAC- CR-018, 2016), por medio de la aplicación del método de prueba para detección de Enterobacterias aplicado a la matriz Chococono.

El sesgo entre las UFC recuperadas y las UFC inoculadas de los resultados obtenidos (Tabla 11) es <0,3 Log, por lo que se concluye que los datos obtenidos por cada analista bajo las mismas condiciones cumplen con el sesgo al obtener resultados cercanos al valor verdadero o real esperado (CCAYAC- CR-018, 2016).

Al realizar la determinación de la Incertidumbre expandida (U) entre los dos analistas bajo las mismas condiciones, se obtuvo un resultado de 0,1521846 en la inoculación baja analizada en el medio VRBG, indicando la presencia de mayores fuentes de error que afectaran la dispersión de los resultados (CCAYAC- CR-018, 2016). Esto pueden ser producto de la composición de la matriz, que contiene una parte de galleta de tipo heladero que genera agrupaciones dificultando la adecuada extracción del inóculo, y a su vez, su adecuada homogenización.

7.3.3. *Staphylococcus* coagulasa positivo

A los 10 lotes del helado Chococono se les aplicó las inoculaciones establecidas en la Tabla 10 para *S. aureus.* Cada analista realizó siembras en superficie por duplicado en agar Baird Parker de los 10 lotes bajo los 2 tipos de inoculaciones, y de los 5 lotes sin inóculo, se llevó a incubar por 48h a 35 ± 1°C. Pasado este periodo de tiempo, se realizó el recuento de las UFC, realizando la corrección del recuento microbiano según crecimiento de colonias típicas y atípicas

sobre el medio Baird Parker, las cuáles se confirmaron por medio del test en tubo con plasma de conejo, dando todas positivas para la prueba de coagulasas, siendo registrado en la hoja de cálculo referenciada en el anexo 3.

De los resultados obtenidos se determinaron los parámetros de desempeño, dando como resultado los datos referenciados en la Tabla 12, iniciando por el grado de Repetibilidad (r), en donde se establece que los resultados analíticos individuales de cada analista bajo cada nivel de inoculación presentan un nivel de concordancia significativa, al obtenerse resultados <3, permitiendo suponer que, al repetir la metodología aplicada se pueden conseguir resultados confiables y consistentes (CCAYAC- CR-018, 2016).

Tabla 12.

Resultados estadísticos de la verificación del método de recuento en placa de Staphylococcus coagulasa positivo *en la matriz Chococono*

	Matriz Chococono		**Repetibilidad (r)**	**Reproductibilidad (R)**	**% Recuperación**	**Sesgo**	**Incertidumbre expandida (U)**
Baird Parker	Analista 1	Inoculación baja	0,0281130053	0,02771171657	99,833667	0,0167	0,18511
	Analista 2		0,0273045307		100,08008	0,0080	
	Analista 1	Inoculación media	0,0062778209	0,005839348146	98,090107	0,1911	0,13268
	Analista 2		0,0053651596		98,721525	0,1279	

Al determinar la Reproductibilidad (R) de la metodología estableciendo el nivel de concordancia entre los resultados analíticos obtenidos por las dos analistas, bajo las mismas condiciones, se obtienen los resultados R < 3 mencionados en la Tabla 12, cumpliendo el criterio de evaluación, por lo que se puede concluir que la metodología utilizada puede ser reproducida por otros analistas obteniendo resultados estadísticos significativos (CCAYAC- CR-018, 2016).

El % de Recuperación obtenido por cada analista (Tabla 12) en todas las determinaciones se encontraron dentro del % de aceptación 90-120% (CCAYAC- CR-018, 2016), por lo que se puede concluir que el método de prueba para detección y cuantificación de *Staphylococcus* coagulasa positiva aplicado a la matriz Chococono permite una recuperación satisfactoria.

La variable de sesgo obtenida por las dos analistas se encuentra dentro del criterio de aceptación <0,3 Log (CCAYAC- CR-018, 2016), como se evidencia en la Tabla 12 por lo que se concluye que los datos obtenidos por cada analista bajo las mismas condiciones estuvieron cercanos al valor verdadero o real esperado.

Al realizar la determinación de la Incertidumbre expandida (U) entre los dos analistas bajo las mismas condiciones, se pudo evidenciar que se presentó una leve incertidumbre en el desarrollo de la metodología para la inoculación baja en el helado a base de crema, esto pudo producirse por un pequeño número de determinaciones que obtuvieron una mínima recuperación (Anexo 3). En la inoculación media se obtuvieron valores más cercanos a 0.1, indicando la presencia de pocas fuentes de error que afectaran la dispersión de los resultados (Tabla 12).

7.3.4. *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*

Cada analista aplicó las inoculaciones establecidas en la Tabla 10 para *S.* Typhimurium y *L. monocytogenes* en 10 lotes seleccionados del helado Chococono, y 5 lotes permanecieron sin inoculación, los cuales se analizaron según la metodología de detección de *Salmonella* spp. establecida por la AOAC 2013.01, y la metodología de detección de *L. monocytogenes* establecida en la AOAC 2013.11, dando como resultado los datos recopilados hoja de cálculo referenciada en el anexo 2 y 4 respectivamente.

Tabla 13.

Resultados estadísticos de la verificación del método detección de Salmonella spp. *en la matriz Chococono.*

***Salmonella* spp.**						
Analistas	Límite detección	Limite selectividad		Repetibilidad	Sensibilidad	Especificidad
		Falso negativo	Falso positivo			
Analista 1 y 2	100%	100%	50%	0%	100%	100%

Tabla 14.

Resultados estadísticos de la verificación del método detección de Listeria monocytogenes en la matriz Chococono

Listeria monocytogenes						
Analistas	Límite detección	Limite selectividad		Repetibilidad	Sensibilidad	Especificidad
		Falso negativo	Falso positivo			
Analista 1 y 2	100%	100%	20%	0%	100%	100%

El desarrollo del análisis estadístico de métodos cualitativos establece la determinación del límite de detección, parámetro de desempeño que establece si el método objeto de verificación puede detectar con fiabilidad una concentración microbiana de <20 UFC/mL en la matriz Chococono. Se obtienen los resultados referenciados en la Tabla 13 y 14 para el inóculo de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* respectivamente, permitiendo evidenciar que cada análisis proporcionó un 100% en el criterio de límite de detección lo que establece que ambos métodos tienen la capacidad de recuperar una inoculación baja de microorganismos, entregando datos confiables.

En la detección del límite de selectividad, se realizó la verificación de los falsos positivos, en el que cada analista realizó los análisis descritos para la detección de *Salmonella* spp. y en paralelo el método de detección de *L. monocytogenes* sobre 5 lotes de Chococono inoculados con >100 UFC/mL del microorganismo control negativo *E. coli*, obteniendo el resultado referenciado en la Tabla 13, y 14 respectivamente, en el que se encuentra un porcentaje del 50% en resultados falsos positivos para el método de detección de *Salmonella* spp. y un porcentaje del 20% de detecciones falso positivo por medio del método de detección de *L. monocytogenes*, esto se puede deber a la cantidad de muestra agregada al receptáculo de fase sólida, que en la detección de *Salmonella* spp. requiere de 500 µl, y en la de *L. monocytogenes* se requiere de un volumen de muestra de 250 µl, lo que puede permitir el ingreso al receptáculo de partículas interferentes en proporción al volumen agregado, lo que pudo generar la mayor proporción de número de falsos positivos en la prueba que requiere más muestra. En la confirmación de los falsos positivos se hizo uso del XLD para la detección de *Salmonella* spp. generando colonias con morfología amarilla, con acidificación parcial y total del medio, producto de la fermentación de la lactosa que se evidencia con el viraje del medio de rojo al amarillo, lo que concuerda con el microorganismo inoculado, ya que esto describe un crecimiento típico de *E.coli* en este medio (Thermo Scientific, s.f.) y, en paralelo se confirmó los falsos positivos producto de la detección de *L. monocytogenes* en el medio Brillante *listeria*, obteniendo resultados sin crecimiento bacteriano, esto debido a los componentes selectivos del medio de cultivo como el cloruro de litio, los antibióticos polimixina B y ácido nalidíxico, activos contra el desarrollo de bacilos Gram negativos fermentadores de lactosa, como *E. coli* (Thermo Scientific, 2023). Estas determinaciones permiten rectificar que los resultados

obtenidos son falsos positivos, al no coincidir el crecimiento microbiano obtenido con el típico de los microrganismos control positivo. Estos resultados respaldan el uso de la metodología de recuento en placa como un respaldo en la verificación de los resultados positivos arrojados por el equipo mini VIDAS, ya que por medio de la identificación morfológica se puede minimizar los riesgos de obtener resultados falsos positivos, que puedan afectar la veracidad de los resultados. Continuo a esto se rectificó de nuevo los resultados falsos positivos en el equipo mini VIDAS, realizando la metodología de forma estricta, con una ejecución de tiempos, temperaturas y homogenización más controlados permitiendo mitigar al máximo las interferencias no especificadas que puedan generar señales equivocas emitiendo resultados erróneos. Al obtener los resultados se determinó que las muestras eran negativas para *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* por lo que se hace necesario hacer énfasis en la rigurosidad del desarrollo del ensayo de fluorescencia ligada a enzimas (ELFA), con el fin de obtener resultados confiables y exactos.

En la determinación de las muestras falsos negativos, las muestras inoculadas con una inoculación baja de los microorganismos controles positivos *S.* Typhimurium, y *L. monocytogenes* por separado, se analizaron bajo la metodologías descritas previamente, en donde se obtuvo un resultado positivo en todas las muestras inoculadas, dando cumplimiento con el 100% de las detecciones realizadas a los microorganismos de interés, y por consiguiente la mitigación de los resultados falso negativos, otorgando confiabilidad en la capacidad del método de detectar la presencia del microorganismo de interés, con una adecuada unión antígeno-anticuerpo, y por ende una correcta producción de fluorescencia (AOAC 2013.01, 2013). Al realizar la verificación de las muestras en el medio XLD para *Salmonella* spp., se obtuvo la

morfología típica de *Salmonella* sulfito reductores positivas , con colonias rojas con centro negro (Thermo Scientific, s.f.), y en el medio Brillante *Listeria* se obtuvo colonias verdes puntiformes con halo alrededor, crecimiento típico de *L. monocytogenes* (Thermo Scientific, 2023), lo que permite rectificar los resultados detectados como positivo.

En la determinación de Sensibilidad, se evidenció que los métodos a verificar sobre la matriz Chococono, presentaron un resultado del 100% (Tabla 13 y 14), lo que determina que los métodos cuentan con una alta sensibilidad (CCAYAC- CR-018, 2016), permitiendo detectar la presencia de *Salmonella* spp., en muestras que en su defecto están inoculadas con *S.* Typhimurium y, de forma paralela detectar a *L. monocytogenes* en muestras inoculadas con este microorganismo, por medio del uso del equipo mini VIDAS, generando resultados confiables.

Al determinar el porcentaje de especificidad, se evidenció que los métodos de detección presentaron un resultado del 100%, lo que establece que estos tienen la capacidad de identificar como pruebas Negativas las muestras que carecen del microorganismo de interés (CCAYAC-CR-018, 2016).

Dentro de las fuentes de incertidumbre asociadas a las mediciones se puede encontrar: uniformidad de la distribución de los microorganismos en la muestra, exactitud de los equipos utilizados, condiciones de tiempo, incubación y, homogenización (CCAYAC- CR-018, 2016).

8. CONCLUSIONES

En la aplicación de la metodología de recuento en placa para el aislamiento y cuantificación de Enterobacterias en helados a base de crema, se presentaron fuentes de error, que se expresaron con una incertidumbre expandida de 0,1521846 en la inoculación baja analizada a través del VRBG, indicando una afectación leve en la dispersión de los resultados. En contraposición las demás variables de análisis presentaron resultados satisfactorios, generando confianza en los resultados obtenidos al realizar la aplicación de esta metodología en helados a base de crema.

Tras verificar la metodología de recuento en placa para la detección y cuantificación de *Staphylococcus* coagulasa positivo, se concluye que es apropiada para el control de calidad del producto terminado de los helados a base de crema, ya que, permite una recuperación efectiva de los microorganismos de interés, y puede ser reproducida por distintos analistas ofreciendo resultados confiables y precisos. A pesar de esto presento una incertidumbre lejana a 0.1, por lo que, se evidencia fuentes de error leves que pudieron dispersar los datos estadísticos.

El método de ensayo de fluorescencia ligada a enzimas (ELFA) demostró ser apto para la detección de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes,* independientemente de la composición de la matriz que lo contenga. Este método no genera falsos negativos, mostrándose sensible con un porcentaje del 100% en ambas técnicas de detección, ofreciendo resultados confiables y coherentes que brindan seguridad sobre la ausencia de los mismos y la inocuidad alimentaria.

En la verificación de la metodología sustentada en el uso del Sistema automático multiparamétrico de inmunoanálisis mini VIDAS se obtuvieron resultados de tipo falso positivo que, al ser rectificados bajo condiciones más rigurosas, se logró obtener el resultado verdadero

esperado (negativo). A partir de estos resultados se concluye que la metodología de detección rápida es una herramienta muy útil para la determinación de microorganismos patógenos en poco tiempo, pero puede presentar gran variabilidad si no se realiza con meticulosidad el control de temperaturas, tiempos de incubación/enfriamiento, características de la matriz, y adecuada homogenización de la muestra, afectando la efectividad de la metodología.

La validación de los resultados positivos entregados por el sistema automático mini VIDAS, a través del uso de medios de cultivo se destaca como practica eficiente en el aseguramiento y prevención de errores aleatorios, contribuyendo en evitar dictámenes erróneos sobre la calidad de los alimentos destinados para comercialización, asegurando la consistencia y fiabilidad de los resultados.

RECOMENDACIONES

Se sugiere verificar las características microbiológicas de las matrices objeto de estudio con métodos alternos a las metodologías a verificar, esto con el fin de evitar sesgos en la selección de las muestras representativas, que conlleven al desarrollo de conclusiones erróneas o poco precisas.

Se recomienda evaluar la posibilidad de incorporar un equipo homogeneizador que garantice la uniformidad de las muestras analizadas de manera rutinaria en el control de calidad del producto terminado, lo que contribuiría a una mayor recuperación de los microorganismos presentes en la muestra, generando resultados más reproducibles y consistentes y, mitigando fuentes de incertidumbre que podrían alterar los análisis realizados.

Se establece la necesidad realizar la metodología de detección por medio del equipo mini VIDAS de manera minuciosa, con un mejor control de la homogenización, tiempos y temperaturas, con el fin de garantizar resultados consistentes y confiables. A su vez, se reafirma la necesidad del uso de la metodología clásica a través de la verificación con medios de cultivo selectivos y diferenciales, que permitan corroborar la fiabilidad del resultado positivo arrojado por el equipo mini VIDAS. Esto brinda una oportunidad para validar los resultados iniciales y, por ende, identificar posibles errores de ejecución que permitan el desarrollo de acciones correctivas y preventivas. De manera complementaria se sugiere implementar el uso de pruebas bioquímicas rápidas como lo son las pruebas API, fortaleciendo la identificación y confiabilidad de los resultados positivos obtenidos por el equipo mini VIDAS.

Se sugiere realizar la metodología completa de detección de Enterobacterias, haciendo uso de las pruebas confirmativas establecidas es la norma ISO 21528-1 (2017), por medio del aislamiento en medio no selectivo de las colonias presuntivas Enterobacterias, para proceder a realizar prueba de fermentación de glucosa y oxidasa, que permitirá entregar un resultado con un mayor rango de confiabilidad.

REFERENCIAS

Association of Official Agricultural Chemists [AOAC]. (2013). *Listeria monocytogenes* en alimentos AOAC 2013.11. Obtenido de Métodos oficiales de análisis de la AOAC. Obtenido de:http://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&cPath=1&products_id=2966

Association of Official Agricultural Chemists [AOAC]. (2013). *Salmonella* spp. en una variedad de alimentos AOAC 2013.01. Obtenido de Métodos oficiales de análisis de la AOAC: Obtenido de: http://www.aoacofficialmethod.org/index.php?main_page=product_info&products_id=2962

Baylis, C., MacPhee, S., & Betts, R. (2000). Comparison of methods for the recovery and detection of low levels of injured *Salmonella* in ice cream and milk powder. Obtenido de Letters in Applied Microbiology, Volume 30, Issue 4. Obtenido de: https://doi.org/10.1046/j.1472 765x.2000.00724.x

bioMérieux (2014). LMX Broth (LMX). Obtenido de https://5.imimg.com/data5/OO/QO/HP/GLADMIN-59766/lmx-infection-capsule.pdf

Bustos-Martínez, J., Hamdan-Partida, A., & Gutiérrez-Cárdenas, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: the reemergence of a pathogen in the community. Revista Biomédica.

Centro Nacional de Referencia de Plaguicidas y Contaminantes [CNRPyC]. (2022). Guía de Validación de Métodos Microbiológicos MEC-PR-GVM 2022.06. Obtenido de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/731570/MEC-PR-GVM_GU_A_DE_VALIDACI_N_DE_M_TODOS_MICROBIOL_GICOS.pdf

Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura [CCAYAC]. (2016). Guía para la Evaluación del Desempeño de Métodos de Prueba Microbiológicos para análisis de alimentos CCAYAC-CR-018.

Crem Helado. (s.f.). Crem Helado Quienes somos. Obtenido de: https://cremhelado.com.co/quienes-somos/

Crem Helado. (s.f.). Política Integral de Gestión.

Goff, H. D. (2013). Ice cream. En In Advanced dairy chemistry volume 2 lipids (págs. 441-450). Boston, MA.

Instituto Nacional de Metrología de Colombia [INM]. (2023). Validación de métodos en análisis químico cuantitativo. GQSP Colombia.

Instituto Nacional de Salud [INS]. (2022). Evaluación De Métodos Cualitativos Para Análisis Microbiológico POE-R01.0000-014. Obtenido de Proceso Redes En Salud Pública: https://www.ins.gov.co/conocenos/sig/SIG/POE-R01.0000-014.pdf

International Organization for Standardization [ISO]. (2017). ISO 21528-1. Obtenido de Método horizontal para la detección y enumeración de *Enterobacteriaceae*. Parte 2: Técnica de conteo de colonias.

International Organization for Standardization [ISO]. (2017). ISO 6579-1. Obtenido de Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella*. Parte 1: Detección de *Salmonella* spp. Obtenido de: https://cdn.standards.iteh.ai/samples/56712/37da386eff674e07b35f9025371ee283/ISO-6579-1-2017.pdf

International Organization for Standardization [ISO]. (2021). ISO 6888 - 1. Obtenido de Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive *Staphylococci* (*Staphylococcus aureus* and other species) Part 1:Method using Baird-Parker agar medium.

Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* Virulencia y patogenicidad, una perspectiva de seguridad alimentaria. Revista de protección de alimentos, 1811–1829, Obtenido de: doi:10.4315/0362-028x-65.11.1811 .

Mercado, C. (2007). Los ámbitos normativos, la gestión de la calidad y la inocuidad alimentaria: una visión integral. Obtenido de: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-03542007000100009

Merck Millipore. (2012). Yeast Glucose Cm Agar (YGC).

Merck Millipore. (2023). Bactident® Coagulase.

Ministerio de Salud y Protección Social [MSPS]. (5 de agosto de 2022). Resolución 1407 de 2022. Obtenido de: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%20No.%201407%20de%202022.pdf

Mladenović, K., Grujović, M., Kiš, M., Furmeg, S., Tkalec, V., Stefanović, O., & Kocić-Tanackov, S. (2021). *Enterobacteriaceae* in food safety with an emphasis on raw milk and meat. En Applied Microbiology and Biotechnology (págs. 1-13).

Norma Técnica Colombiana [NTC] 1239. (2002). Helados y mezclas para helados. Obtenido de: https://www.midagri.gob.pe/portal/download/pdf/direccionesyoficinas/dgca/normatividad-lacteos/Colombia/NTC_Helados_y_Mesclas_para_Helados_1239.pdf

Ortiz et al. (2011). Inocuidad Alimentaria: Panorama en Colombia. 1, 37-44. Obtenido de Conexión agropecuaria JDC. Obtenido de: https://revista.jdc.edu.co/index.php/conexagro/article/view/345

Parra, M., Durango, J., & Máttar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. En Revista MVZ Córdoba (págs. 187-200).

Pro Lab Diagnostics . (s.f.). Plasma de coagulasa de conejo. Obtenido de https://www.pro-lab.com/wp-content/uploads/2017/01/PL850products_Rabbit-Coagulase-Plasma_Spanish.pdf

Thermo Fisher. (s.f.). Baird-Parker Agar (ISO) Base. Obtenido de http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1127&c=UK&lang=EN

Thermo Scientific. (2023). Base de agar para *Listeria* Brilliance. Obtenido de https://www.fishersci.es/shop/products/oxoid-brilliance-listeria-agar-base/10770714#:~:text=Descripci%C3%B3n-,La%20base%20de%20agar%20para%20listeria%20Brilliance%20es%20un%20medio,de%20Listeria%2C%20incluida%20Listeria%20monocytogenes.&text=Listeria%20mo

Thermo Scientific. (s.f.). Agar XLD. Obtenido de: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0469&c=UK&lang=EN

Thermo Scientific. (s.f.). Glucosa Bilis Roja Violeta (VRBG) (ISO). Obtenido de: http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1082%20&c=UK&lang=EN&org=66&print=Y

Una Norma Española (UNE) Norma Europea (EN) Organización Internacional de Normalización (ISO). (2001). UNE-EN ISO 11133-1. Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua. Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo. Modificación 1.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis estadístico de la detección y cuantificación de Enterobacterias en la matriz Chococono, haciendo uso del medio VRBG.

Link: https://docs.google.com/spreadsheets/d/e/2PACX-1vSx_JcAOjlHzDPk8tNAUpe9n2dFzkwgefo5SFKzknhjvoJyUtooIJwhbPB7vrhQN32PNa2FEuy-DyC4/pubhtml?gid=643192550&single=true

Anexo 2. Análisis estadístico de la detección de *Salmonella* spp. en la matriz Vaso Kola y Chococono.

Link: https://docs.google.com/spreadsheets/d/e/2PACX-1vSx_JcAOjlHzDPk8tNAUpe9n2dFzkwgefo5SFKzknhjvoJyUtooIJwhbPB7vrhQN32PNa2FEuy-DyC4/pubhtml?gid=693698901&single=true

Anexo 3. Análisis estadístico de la detección y cuantificación de *Staphylococcus* coagulasa positiva en la matriz Chococono.

Link: https://docs.google.com/spreadsheets/d/e/2PACX-1vSx_JcAOjlHzDPk8tNAUpe9n2dFzkwgefo5SFKzknhjvoJyUtooIJwhbPB7vrhQN32PNa2FEuy-DyC4/pubhtml?gid=298488553&single=true

Anexo 4. . Análisis estadístico de la detección de *L. monocytogenes* en la matriz Chococono.

Link: https://docs.google.com/spreadsheets/d/e/2PACX-1vSx_JcAOjlHzDPk8tNAUpe9n2dFzkwgefo5SFKzknhjvoJyUtooIJwhbPB7vrhQN32PNa2FEuy-DyC4/pubhtml?gid=122704951&single=true