

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



**“DISMINUCIÓN DEL TIEMPO DE LIBERACIÓN AL MERCADO
PARA YOGURT MEDIANTE LA IMPLEMENTACIÓN DE UN
SISTEMA DE CITOMETRÍA DE FLUJO”**

**TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR EL
TÍTULO DE INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

CARLOS ALBERTO LAÍNEZ ARIAS

LIMA - PERÚ

2023

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24 - Reglamento de Propiedad Intelectual)**

Document Information

| | |
|-------------------|---|
| Analyzed document | Laines 2F Tesis 10.10.2021-1.pdf (D129073740) |
| Submitted | 2022-02-28T20:19:00.0000000 |
| Submitted by | Patricia Glorio-Paulet |
| Submitter email | pgp@lamolina.edu.pe |
| Similarity | 1% |
| Analysis address | pgp.unalm@analysis.arkund.com |

Sources included in the report

| | | |
|-----------|--|---|
| SA | TESIS FINAL.pdf Document TESIS FINAL.pdf (D21990136) |  1 |
| SA | 14 TITULACIÓN.pdf Document 14 TITULACIÓN.pdf (D101653367) |  1 |
| W | URL: https://miherbayurt.wordpress.com/2008/11/30/sepa-mas-del-yogurt/ Fetched: 2022-02-28T20:20:57.1570000 |  1 |
| W | URL: https://vsip.info/proceso-productivo-del-yogurt-pdf-free.html Fetched: 2022-02-28T20:20:46.3170000 |  3 |

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

**“DISMINUCIÓN DEL TIEMPO DE LIBERACIÓN AL MERCADO
PARA YOGURT MEDIANTE LA IMPLEMENTACIÓN DE UN
SISTEMA DE CITOMETRÍA DE FLUJO”**

Presentado por:

CARLOS ALBERTO LAÍNEZ ARIAS

**TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR EL TÍTULO
DE INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

Dr. Milber O. Ureña Peralta

PRESIDENTE

Dr. Edwin O. Baldeón Chamorro

MIEMBRO

Dr. Luis A. Condezo Hoyos

MIEMBRO

Patricia Glorio Paulet, PhD

ASESORA

Lima – Perú

2023

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a Chicho, por su ejemplo de constancia y perseverancia.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

| | |
|--|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. YOGURT | 3 |
| 2.1.1. Definición..... | 3 |
| 2.1.2. Composición del Yogurt | 3 |
| 2.1.3. Microbiología del Yogurt..... | 5 |
| 2.2. ANALISIS DE HONGOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS | 5 |
| 2.3. CITOMETRIA DE FLUJO | 6 |
| 2.3.1. Generalidades | 6 |
| 2.3.2. Ventajas de la citometría de flujo..... | 6 |
| 2.4. CITOMETRO DE FLUJO: CHEMUNEX D-COUNT | 7 |
| III. METODOLOGÍA | 10 |
| 3.1. LUGAR DE EJECUCION | 10 |
| 3.2. MATERIA PRIMA | 10 |
| 3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS | 11 |
| 3.3.1. Materiales | 11 |
| 3.3.2. Equipos..... | 12 |
| 3.3.3. Reactivos | 12 |
| 3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS | 12 |
| 3.4.1. Análisis Levaduras Sistema D Count 25..... | 13 |
| 3.4.2. Análisis de hongos y levaduras recuento en placa con agar SDA..... | 14 |
| 3.5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL..... | 15 |
| 3.5.1. Diagnóstico de la situación actual de liberación de yogurt..... | 15 |
| 3.5.2. Compatibilidad de los diferentes tipos de yogures con la metodología de citometría de flujo..... | 16 |
| 3.5.3. Desempeño de la metodología de citometría de flujo en la detección de dos cepas de levaduras propias del yogurt | 16 |
| 3.5.4. Validación del método..... | 17 |
| 3.6. ANÁLISIS DE RESULTADOS | 17 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 18 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1. DIAGNÓSTICO DE LA SITUACIÓN ACTUAL: LIBERACIÓN DE YOGURT | 18 |
| 4.2. DEMOSTRAR LA COMPATIBILIDAD DE LA METODOLOGÍA APLICADA EN LOS DIFERENTES TIPOS DE YOGURT | 20 |
| 4.3. PROBAR EL DESEMPEÑO DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA EN LA DETECCIÓN DE DOS CEPAS DE LEVADURAS PROPIAS DE YOGURT | 20 |
| 4.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO | 25 |
| 4.5. APLICACIÓN DE LAS COMPETENCIAS PROFESIONALES | 25 |
| V. CONCLUSIONES | 28 |
| VI. RECOMENDACIONES | 29 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | 30 |
| VIII. ANEXOS | 33 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Composición de 100g de yogurt | 4 |
| Tabla 2: Especificaciones técnicas de los tipos de yogurt | 4 |
| Tabla 3: Especificaciones de calidad sanitaria e inocuidad del yogurt | 5 |
| Tabla 4: Información laboratorio de calidad | 18 |
| Tabla 5: Promedio de resultados de la prueba de compatibilidad de producto | 21 |
| Tabla 6: Agrupación de las variedades de yogurt en la empresa ABC para la prueba de desempeño analítico | 22 |
| Tabla 7: Promedio de resultados de la prueba de desempeño metodología SDA..... | 24 |
| Tabla 8: Resumen de resultados etapa de equivalencia | 26 |
| Tabla 9: Cursos y conocimientos adquiridos y aplicados en el desempeño laboral | 27 |
| Tabla 10: Cursos y conocimientos adquiridos y aplicados en el control de calidad de los yogurts analizados en la empresa láctea ABC | 27 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Detección de una célula por marcaje..... | 8 |
| Figura 2: Sensibilidad de la Citometría de Flujo..... | 9 |
| Figura 3: Diagrama del procedimiento para detección de levaduras en productos lácteos fermentados | 13 |
| Figura 4: imagen de resultados en el software del sistema Chemunex D Count..... | 14 |
| Figura 5: Diagrama de la técnica de recuento en placa de hongos y levaduras con agar SDA..... | 19 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| ANEXO 1: RESULTADOS OBTENIDOS EN EL SISTEMA D COUNT 25..... | 34 |
| ANEXO 2: PROCEDIMIENTO BIOMERIEUX 403 D711-02 DETECCION DE LEVADURAS EN PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS..... | 35 |
| ANEXO 3: RESULTADOS DE LA ETAPA DE COMPATIBILIDAD DE PRODUCTO36 | |
| ANEXO 4: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE DESEMPEÑO ANALITICO EN EL SISTEMA CHEMUNEX | 40 |
| ANEXO 5: RESULTADOS DE LA PRUEBA DE DESEMPEÑO ANALITICO PARA LA METODOLOGIA SDA | 41 |
| ANEXO 6: FICHA TECNICA AGAR SABOURAUD DEXTROXA BD..... | 43 |

RESUMEN

La citometría de flujo es una técnica bastante eficiente para la detección temprana de contaminación en productos lácteos y bebidas, por lo que actualmente estas industrias de alimentos la vienen empleando para obtener la liberación más temprana de sus productos al mercado, permitiéndose asegurar una ganancia de tiempo de vida útil de sus productos en el mercado. El presente trabajo consistió en la implementación de un método rápido de detección microbiológica basado en citometría de flujo aplicado a una empresa láctea para su línea de yogurt con el objetivo de disminuir su tiempo de liberación al mercado. En una primera etapa se realizó un diagnóstico de la empresa, demostrándose que tenía los volúmenes de producción y análisis adecuados para la implementación de esta tecnología. En una segunda etapa se probó la compatibilidad del método de citometría de flujo con la matriz yogurt, realizándose un análisis por triplicado para cada una de las 38 variedades producidas por la empresa. En la tercera etapa se comprobó de la eficiencia en la detección del método, inoculando una solución contaminada a concentración de 10 ufc/ml de 02 cepas de levadura características, para lo que se agrupó en 08 familias a los yogures evaluados según sus características similares. Finalmente, en la cuarta etapa, se realizaron cerca de mil análisis en las líneas de producción tanto para el método implementado como para el método de recuento en placa, validando el método de citometría de flujo mediante una prueba de correspondencia con el otro método. De esta manera con la implementación del método de citometría de flujo se logró disminuir el tiempo de liberación del yogurt al mercado de cinco días a 30 horas.

Palabras clave: yogurt, citometría de flujo, liberación al mercado, levaduras, chemunex, recuento en placa.

ABSTRACT

Flow cytometry is an efficient technique for the early detection of contamination in dairy products and beverages, this is the reason why these food industries are currently using flow cytometry to obtain the earliest release of their products to the market, allowing them to ensure time savings of shelf life for their products in the market. The present research is about the implementation of a rapid microbiological detection method based on flow cytometry applied to a dairy company in their yogurt production lines with the purpose of reducing the release time to the market. In a first stage, a diagnosis of the company was made, showing that they had the appropriate production and analysis volumes for the implementation of this technology. In a second stage, the compatibility of the flow cytometry method with the yogurt matrix was tested, performing an analysis in triplicate for each of the 38 varieties produced by the company. In the third stage, the detection efficiency of the method was verified by inoculating a contaminated solution at a concentration of 10 cfu/ml of 02 characteristic yeast strains, for which the yogurts evaluated were grouped into 08 families according to their similar characteristics. Finally, in the fourth stage, about a thousand analyzes were carried out on the production lines for both the implemented method and the plate count method, validating the flow cytometry method through a correspondence test with the other method. In this way, with the implementation of the flow cytometry method, it was possible to reduce the time of release of yogurt to the market from five days to 30 hours.

Keywords: yogurt, Flow cytometry, release to the market, yeast, chemunex, plate count.

I. INTRODUCCIÓN

La liberación de alimentos procesados al mercado exige hoy en día a las compañías fabricantes no solamente llevar a cabo un estricto control de calidad para asegurar la inocuidad de sus productos, sino también asegurar su disponibilidad en el mercado en el menor tiempo posible. Es así como actualmente existen una gran variedad de análisis microbiológicos para comprobar la inocuidad de los lotes de producción.

Las metodologías más ampliamente utilizadas son las técnicas tradicionales de detección, siendo las principales los recuentos en placa con agar. Estas técnicas se caracterizan en la gran mayoría de los casos por el largo tiempo en la obtención de los resultados, así como por la extensa cantidad de pasos manuales que emplean. Estas características hacen disminuir su confiabilidad debido al alto número de posibles fuentes de error, siendo poco recomendados por su baja productividad para compañías con altos volúmenes de producción. Por otro lado, existen las metodologías alternativas o rápidas con una mayor sensibilidad y que permiten detecciones en tiempos menores, otorgando a las empresas mayor confiabilidad en sus resultados a la vez que ahorros en los costos de almacenamiento debido a cuarentenas más cortas y como consecuencia tiempos de vida más largos para sus productos en el mercado.

El yogurt y los productos lácteos fermentados una vez envasados son almacenados entre 5 y 7 días hasta su liberación al mercado, tiempo en que las metodologías tradicionales de recuento en placa con agar permiten cuantificar una contaminación de hongos y levaduras. Los hongos y levaduras son buenos indicadores de la calidad sanitaria para este tipo de alimentos, siendo éstos los parámetros que toman mayor tiempo de detección dentro de los microorganismos propuestos por DIGESA en los criterios microbiológicos establecidos por su norma sanitaria. La empresa láctea ABC es una de las principales compañías dedicadas a la producción láctea en el país, procesan diariamente 120 toneladas de leche entre sus dos plantas en Lima y Arequipa y con la cual elaboran diferentes productos derivados de ésta. Uno de los principales derivados lácteos elaborados por la empresa son las leches

fermentadas, productos por lo que son ampliamente conocidos en el mercado tanto por su calidad como variedad.

A través de la implementación de la metodología rápida de detección basada en la citometría de flujo se espera disminuir los tiempos de liberación de las variedades de yogurt fabricadas en la empresa láctea ABC; con la finalidad de ganar tiempo de vida útil, obtener ahorros en el almacenamiento durante la cuarentena y obtener una respuesta temprana de contaminación o no en sus productos para tomar acciones correctivas.

El objetivo general del presente trabajo fue el de disminuir el tiempo de resultados microbiológicos y a su vez la liberación de yogurt al mercado a través de la implementación del sistema de citometría de flujo Chemunex para la empresa ABC. Los objetivos específicos fueron:

- Diagnosticar la situación actual referente a la liberación microbiológica de las líneas de producción de yogurt en la empresa láctea ABC.
- Demostrar la compatibilidad de producto con la metodología de citometría de flujo empleada para los diferentes tipos de yogurt que produce la empresa láctea.
- Probar la eficacia de la metodología de citometría de flujo mediante la detección de 02 cepas de levadura previamente inoculadas.
- Validar el método de citometría de flujo en la línea de producción de yogurt.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. YOGURT

2.1.1. Definición

Según el CODEX Alimentarius (2011) en su norma para las leches fermentadas, yogurt es el producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, que puede haber sido elaborado a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en la composición por medio de la acción de los microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación. Los cultivos de microorganismos presentes deberán ser viables, activos y abundantes.

Romero y Mestres (2004) mencionan que una característica intrínseca de todo yogurt es que los microorganismos responsables de su fermentación deben ser viables y estar presentes en el producto terminado en cantidad mínima de 1 por 10^7 colonias por gramo o mililitro.

2.1.2. Composición del Yogurt

La tabla peruana de composición de alimentos muestra la composición de química del yogurt para las variedades: yogurt de leche entera, yogurt frutado de leche semidescremada, yogurt frutado de leche descremada y yogurt natural de leche descremada como se aprecia en la tabla 1; las especificaciones técnicas se muestran en la tabla 2.

Tabla 1: Composición de 100g de Yogurt

| | Energía kcal | Energía kJ | Agua g | Proteínas g | Grasa total g | Carbohidratos totales g | Carbohidratos disponibles g | Fibra cruda g | Fibra dietaria g | Cenizas g |
|--|--------------|------------|--------|-------------|---------------|-------------------------|-----------------------------|---------------|------------------|-----------|
| Yogur de leche entera | 61 | 225 | 87.9 | 3.5 | 3.3 | 4.7 | 4.7 | 0 | 0 | 0.7 |
| Yogur frutado de leche semidescremada | 97 | 406 | 73.8 | 4.1 | 2.8 | 18.5 | 18.2 | 0 | 0.3 | 0.8 |
| Yogur frutado leche descremada | 95 | 397 | 75.4 | 4.4 | 0.2 | 19 | 19 | 0 | 0 | 1 |
| Yogur natural leche descremada | 56 | 234 | 85.2 | 5.7 | 0.2 | 7 | 7.7 | 0 | 0 | 1.2 |

FUENTE: MINSA (2009)

Tabla 2: Especificaciones técnicas de los tipos de yogurt

| Característica | Unidad | Yogurt entero* | Yogurt parcialmente descremado** | Yogurt descremado** |
|---|---------------|-----------------------|---|----------------------------|
| Materia grasa láctea | g/100g | Mínimo 3.0 | 0.6 - 2.9 | Máximo 0.5 |
| Sólidos no grasos lácteos | g/100g | Mínimo 8.2 | Mínimo 8.2 | Mínimo 8.2 |
| Acidez valorable expresada como % de ácido láctico | g/100g | Mínimo 0.6 | Mínimo 0.6 Máximo 1.5 | Mínimo 0.6 Máximo 1.5 |
| Proteína láctea (N x 6.38) | g/100g | Mínimo 2.7 | Mínimo 2.7 | Mínimo 2.7 |

*Elaborado a base de leche entera. Codex Alimentarius

**Elaborado a base de leche parcialmente descremada y descremada. NTP

FUENTE: MINAGRI (2017)

Adicionalmente, Romero y Mestres (2004) proponen los siguientes tipos de yogurt en función a sus componentes.

- Yogurt natural, no posee adición de azúcares u otros productos.
- Yogurt azucarado, es el yogurt natural al que se ha añadido azúcar o azúcares comestibles.
- Yogurt edulcorado, es el yogurt natural al que se ha añadido edulcorantes autorizados.
- Yogurt con fruta, zumos y/u otros productos naturales, es el yogurt natural al que se ha añadido frutas, zumos y/u otros productos naturales.
- Yogurt aromatizado, el yogurt natural al que se ha añadido agentes aromáticos autorizados.

2.1.3. Microbiología del Yogurt

La normativa peruana establece como criterios microbiológicos para el yogurt y leches fermentadas un límite microbiológico “m” de 10 ufc/g y un “M” de 100 ufc/g tanto para coliformes, hongos y levaduras según se indica en la tabla 3, donde: valores iguales o menores a “m” representa un producto aceptable y valores superiores a “m” indican lotes aceptables o inaceptables; mientras que valores superiores a “M” son inaceptables, ya que el alimento representa un riesgo para la salud (MINSA, 2008).

Tabla 3: Especificaciones de calidad sanitaria e inocuidad del yogurt

| Agente Microbiano | Categoría | Clase | n | c | Limite por g | |
|-------------------|-----------|-------|---|---|--------------|-----------------|
| | | | | | m | M |
| Coliformes | 5 | 3 | 5 | 2 | 10 | 10 ² |
| Mohos | 2 | 3 | 5 | 2 | 10 | 10 ² |
| Levaduras | 2 | 3 | 5 | 2 | 10 | 10 ² |

Categoría: Grado de riesgo que representa los microorganismos en relación con las condiciones previsibles de manipulación y consumo del alimento.

Clase: Es la clasificación que se da a los planes de muestreo por atributos que pueden ser de dos o tres.

FUENTE: MINAGRI (2017)

Laplace-Builhe et al. (1993) coinciden con Vallejo y Toro (2002), en que la contaminación de productos de leche fermentada con hongos y levaduras es la mayor preocupación de las industrias de transformación de la leche, ya que la presencia de estos microorganismos aun en una baja concentración puede afectar severamente su calidad siendo capaces de producir micotoxinas altamente patógenas para el ser humano, por lo que se hace necesaria su detección en planta.

2.2. ANALISIS DE HONGOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS

Existen diferentes metodologías empleadas para la enumeración de hongos y levaduras, dentro de las más usadas se encuentran las técnicas tradicionales de recuento en placa, las cuales emplean diferentes medios de cultivo.

Las técnicas basadas en recuentos en placas de agar tienen como característica la demora en la obtención de resultados ya que el tiempo recomendado para realizar estos recuentos oscila

entre 3 y 7 días. Además, la preparación de muestras y las siembras es bastante laboriosa, siendo recomendable disponer de una zona de trabajo adecuada para ello. (Valdés, 2007)

2.3. CITOMETRIA DE FLUJO

2.3.1. Generalidades

En el mercado existen diferentes metodologías rápidas para detección de microorganismos en alimentos. Las metodologías directas están basadas en la enumeración de las células bacterianas; mientras que las indirectas se clasifican en tres grupos. El primero se basa en la medición del desarrollo de las células, es en este grupo que encontramos a la citometría de flujo. El segundo grupo mide concentraciones específicas en la célula como el ATP o polisacaridasa y el tercer grupo determina la formación de compuestos metabolizados a través de la transformación de sustratos durante su almacenamiento (Fernández y Hernández, 2006).

Los sistemas de citometría de flujo son sistemas capaces de detectar microorganismos viables presentes en los productos, es decir que posean actividad enzimática e integridad de membrana realizando una tinción fluorescente que será detectada por un láser a través de su paso por una celda de flujo de cuarzo del citómetro formado por un pequeño flujo laminar que permite el paso de los microorganismos uno por uno a través el haz de excitación del láser. Los sensores captan las señales fluorescentes de cada célula; el análisis y diferenciación de las células se basa en su tamaño (Macey, 2007).

2.3.2. Ventajas de la citometría de flujo

Según Laguado (2007), las ventajas de utilizar la citometría de flujo son: 1) la velocidad con la cual se obtienen y procesan los datos; 2) la capacidad de separación (cell sorting) que permite el aislamiento de poblaciones específicas e incluso células individuales para un posterior estudio; 3) la adquisición rápida de múltiples datos para su posterior análisis; 4) la posibilidad de ser una técnica tanto cualitativa como cuantitativa.

Las principales ventajas que proporciona la citometría de flujo frente a otros métodos de medición son la objetividad en los resultados, su elevada sensibilidad, velocidad de análisis

y la posibilidad de realizar mediciones simultáneas. Contrariamente, las principales desventajas son los costos de instrumentación y la incapacidad de visualizar las células analizadas (Moreno-Ortiz, 2008).

La citometría de flujo brinda un recuento rápido en productos terminados como el yogurt, permitiendo su liberación temprana al consumidor. El manejo del tiempo de vida puede ser incluso mejorado gracias a la relación que se logra entre el nivel de contaminación por levaduras hallado y la calidad del producto en su fecha de expiración (Laplace-Builhe et al., 1993).

La citometría de flujo es una técnica muy útil y poderosa para el análisis rápido de microorganismos en la industria de alimentos que cada vez posee mayor disponibilidad, menores costos y equipos más amigables para el usuario, por sus reactivos listos para usar y equipos cada vez más pequeños (Taitt & North, 2015).

2.4. CITOMETRO DE FLUJO: CHEMUNEX D-COUNT

El sistema Chemunex D Count es una tecnología desarrollada por la empresa bioMerieux – Francia, capaz de detectar microorganismos en una amplia variedad de lácteos, bebidas y productos cosméticos. Las muestras se tratan con reactivos que marcan los microorganismos viables que puedan estar presentes en los productos. Solo los microorganismos viables con actividad enzimática e integridad de membrana reaccionan con el sustrato en el interior de la célula liberando fluorocromo. Posteriormente, la muestra es inyectada en la celda de flujo de cuarzo del citómetro formando un pequeño flujo laminar que permite el paso de los microorganismos uno por uno a través del haz de excitación del láser. Los sensores captan las señales fluorescentes de cada célula (bioMerieux SA, 2016), tal como se muestra en la figura 1.

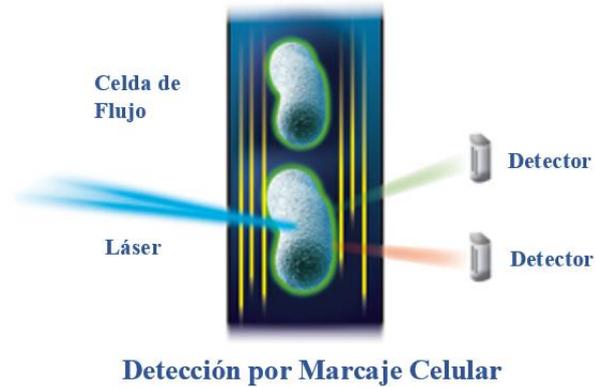


Figura 1: Detección de una célula por marcaje

FUENTE: bioMerieux (2018)

El protocolo que se empleó es un test cualitativo donde las muestras se incuban durante varias horas antes de ser procesadas siguiendo el protocolo para productos lácteos fermentados.

Laplace-Builhe et al. (1993) realizaron un estudio de detección rápida de hongos y levaduras en productos lácteos fermentados en la empresa láctea alemana Nordbuther empleando el sistema Chemunex de citometría de flujo. Los resultados indicaron que esta tecnología detectó niveles de contaminación inicial menores a 5 esporas/g en hongos y menores a 0.5 levaduras/g dentro de las 24 horas. Resultados con valores iguales o mayores a 100 counts/g en muestras analizadas en el sistema Chemunex para el protocolo de detección de leches fermentadas son considerados como muestras contaminadas.

El sistema Chemunex D Count es un equipo automatizado diseñado para brindar resultados rápidos y con gran sensibilidad en un amplio rango de productos, desde leche fermentada y jugos hasta lociones y cremas (Diaz et al; 2009), tal como se aprecia en la figura 2.

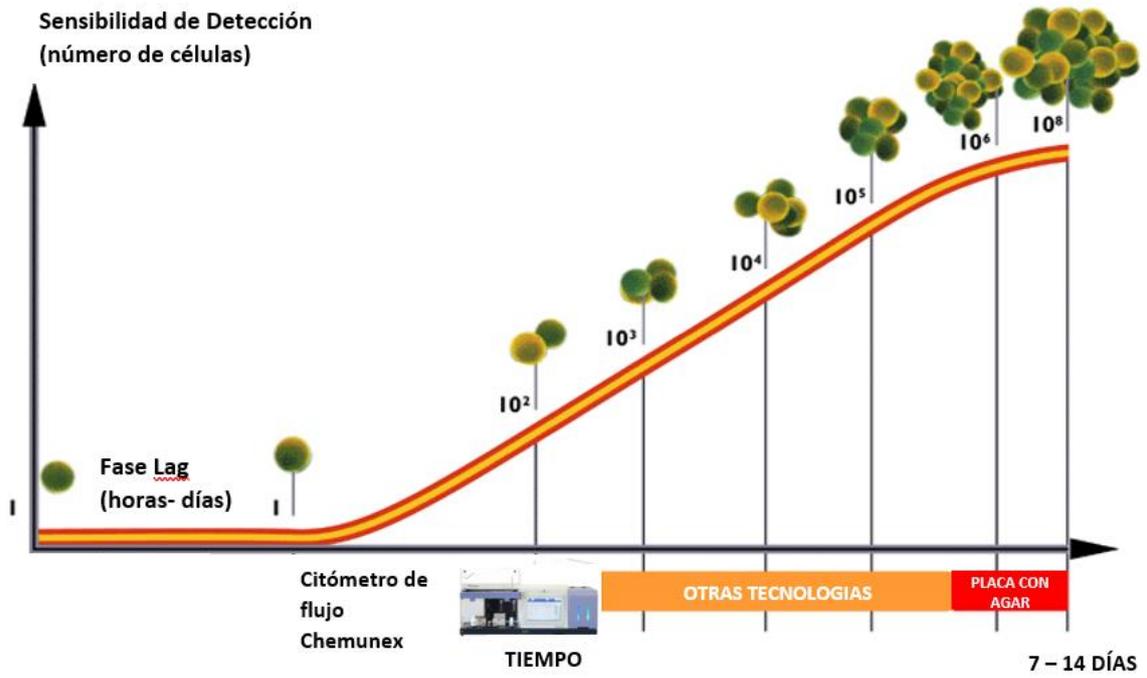


Figura 2: Sensibilidad de la Citometría de Flujo

FUENTE: bioMerieux (2018)

III. METODOLOGÍA

3.1. LUGAR DE EJECUCION

Las actividades del presente trabajo se realizaron en Laboratorio de Control de calidad de la Empresa ABC S.A; ubicada en Ate, Lima-Perú.

3.2. MATERIA PRIMA

La materia prima analizada fueron productos terminados de las líneas de yogurt de la empresa ABC. Se trabajó con los siguientes productos terminados:

- Yogurt biodefensa Fresa
- Yogurt biodefensa Vainilla/ Vainilla Light
- Yogurt biodefensa Piña
- Yogurt biodefensa Fresa Frambuesa Light
- Yogurt biodefensa Kids Uva Mora
- Yogurt biodefensa Kids Tutti Frutti
- Yogurt Niños Durazno B
- Yogurt Niños Vainilla Francesa B
- Yogurt Durazno
- Yogurt Fresa
- Yogurt Vainilla Francesa
- Yogurt Lúcumá
- Yogurt Guanábana
- Yogurt Mora
- Yogurt Guindón
- Yogurt Granadilla Linaza
- Yogurt Ciruela Linaza
- Yogurt Plátano

- Yogurt Coco
- Yogurt Piña Colada
- Yogurt Natural
- Yogurt 0% Lactosa Piña Familiar
- Yogurt MD Vainilla Francesa
- Yogurt Griego Durazno
- Yogurt Griego Blueberry
- Yogurt Griego Fresa 0% Grasa
- Yogurt Griego 0% Grasa Natural
- Yogurt Niños Durazno
- Yogurt Niños Vainilla Francesa
- Yogurt Niños Fresa
- Yogurt Mix Fresa
- Yogurt Mix Vainilla Yopi
- Yogurt Yopi Fresa
- Leche Cultivada
- Yogurt Biofrutado Cocktail Frutas Vaso
- Yogurt Biofrutado Fresa
- Yogurt Biofrutado Piña Linaza Vaso
- Yogurt Biofrutado Durazno Vaso

3.3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.3.1. Materiales

- Tubos de 20 mL para las muestras (20 mL tubes)
- Tapón para tubos 20 mL (20mL Stoppers)
- Filtro de porosidad 25 μ m (ChemFilter 25)
- Filtro de disco con una porosidad de 17 μ m (ChemFilter D17)
- Dispensadores de 10mL
- Rack para tubos 20mL
- Micropipetas regulables (rango 100 -1000 μ l)

3.3.2. Equipos

- Sistema Chemunex D Count 25 (unidad preparadora de muestras+ unidad Analizador) marca Chemunex- bioMerieux.
- Cámara de Incubación 25 – 30 °C Fabricación Inhouse Planta ABC SA
- Centrífuga S16 TX400 marca Thermo Scientific
- Agitador tipo Vórtex-Mezclador marca Boeco V1 Plus
- Baño Maria 28L Marca Nickel Electro
- Balanza de precisión marca Sartorius modelo Entris 822 1S
- Refrigeradora 2 – 8°C marca Ilumi

3.3.3. Reactivos

- Líquido de lavado de la Unidad de preparación (ChemSol S)
- Líquido de lavado concentrado (ChemSol S 50x)
- Suplemento de solución de lavado (ChemSol S/1 Supplement)
- Solución tampón (ChemSol A24/1)
- Solución tampón de marcaje para bacterias levaduras y mohos (ChemSol B24)
- Sustrato de marcaje para levaduras (ChemChrome V24)
- Enmascarador de partículas fluorescentes (CSF)
- CSD (Lograr solubilidad de productos)
- CS24 kit (Elimina interferencia de bifidobacterium)
- Solución reductora de la fluorescencia libre (CSR12)
- Diluyente el polvo CSR (Diluent II)
- Solución antioxidante (Isored)
- Solución de limpieza para la celda de flujo (Cleaning 5)
- Antiespumante (Antifoam)
- Solución de limpieza para unidad de preparación y el analizador (Cleaning 3)

3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Se emplearon dos metodologías de análisis; la metodología tradicional de recuento en placa con el Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) y la metodóloga alternativa de Citometría de Flujo Chemunex de bioMerieux.

3.4.1. Análisis Levaduras Sistema D Count 25

Se empleó la prueba cualitativa para detección de levaduras en productos lácteos fermentados (ver anexo 2).

El procedimiento consiste en una incubación previa de la muestra a analizar un mínimo veinticuatro horas a temperaturas de entre veinticinco y treinta grados centígrados. Posteriormente se realiza el tratamiento de la muestra que comprende una dilución, un homogenizado en mixer, un calentamiento en baño maría y una centrifugación, con la finalidad de separar y eliminar la pulpa y partículas propios del producto y que no son requeridos. Finalmente se realiza al análisis de la muestra en el equipo donde será leído a su paso por la celda de flujo y a través de un láser con una fluorescencia de 488nm por detectores que realizan un conteo de las células de los microorganismos (ver figura 3).

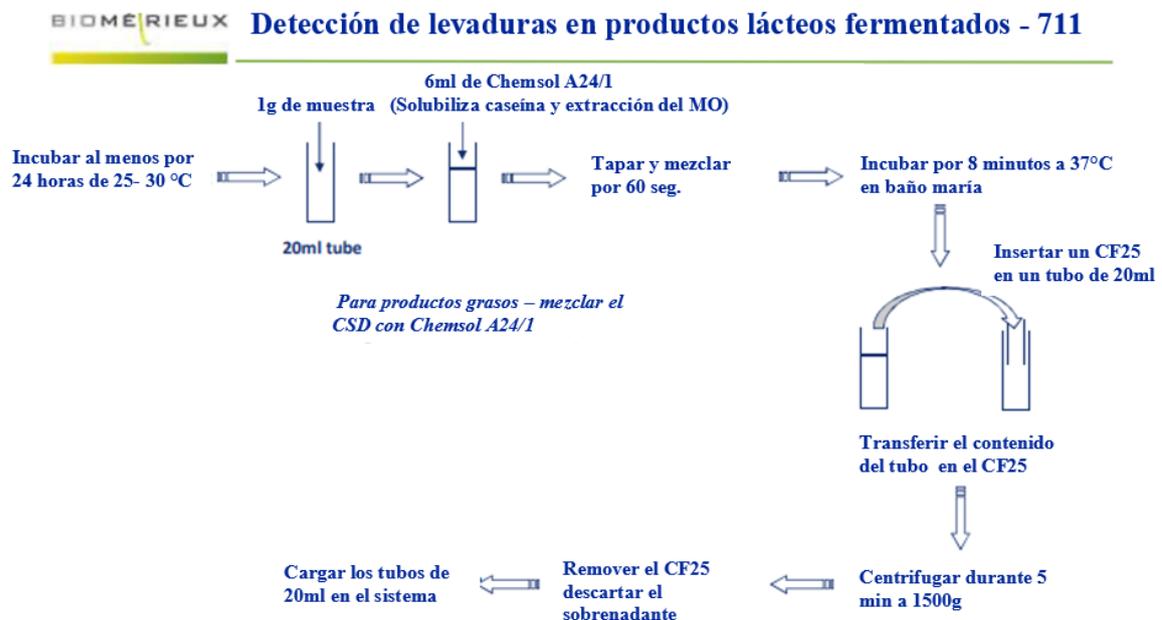


Figura 3: Diagrama del procedimiento para detección de levaduras en productos lácteos fermentados

FUENTE: bioMerieux (2016)

El resultado final entregado por el software del equipo consiste en un cuadro donde se puede apreciar la siguiente información para cada columna: número de muestra (donde la muestra número uno corresponde siempre al control negativo y la última al control positivo); identificación de la muestra, hora en que fue ejecutada la prueba y finalmente el resultado. Este puede ser positivo o negativo y se visualiza como un círculo de color rojo o un cuadrado

de color verde respectivamente para cada muestra analizada (ver ANEXO 1), siendo una muestra positiva aquella que al término de la incubación posea una lectura interna del equipo mayor de 100 counts/ml equivalente a una contaminación por encima del valor exigido en la norma; y una muestra negativa, aquella que posea una lectura interna menor a 100 counts/ml (ver figura 4).

Al tratarse de un test cualitativo, solamente se apreciará un resultado de color, donde el resultado puede ser contaminado o no. Como se tiene un paso de pre-enriquecimiento, no se puede saber el nivel inicial de microorganismos, solo se puede concluir que el producto fue contaminado con un mínimo de 1MO por volumen de muestra.

| # | Sample ID | Time | Lot Number | Sampling | Manuf. | Comments | Counts/ml |
|----|-----------|----------|------------|----------|--------|----------|-----------|
| 1 | Neg Ctrl | 09:44:01 | | | | | ✓ |
| 2 | L | 09:46:14 | | | | | ✓ |
| 3 | L | 09:48:27 | | | | | ✓ |
| 4 | L | 09:50:40 | | | | | ✓ |
| 5 | L | 09:52:53 | | | | | ✓ |
| 6 | L | 09:55:06 | | | | | ✓ |
| 7 | L | 09:57:19 | | | | | ✓ |
| 8 | M | 09:59:32 | | | | | ✗ |
| 9 | M | 10:01:45 | | | | | ✗ |
| 10 | M | 10:03:58 | | | | | ✗ |
| 11 | M | 10:06:11 | | | | | ✗ |
| 12 | M | 10:08:24 | | | | | ✗ |
| 13 | M | 10:10:37 | | | | | ✗ |

Figura 4: imagen de resultados en el software del sistema Chemunex D Count

FUENTE: bioMerieux (2018)

3.4.2. Análisis de hongos y levaduras recuento en placa con agar SDA

Se empleo la metodología de recuento en placa con el agar Sabouraud Dextrose, para lo cual se preparó el agar según lo indicado por la empresa Becton Dickinson en su ficha técnica

BBL Sabouraud Dextrose Agar para la preparación de este medio que incluye los pasos de ebullición en baño María, enfriamiento a 45- 50°C y vertido en placas Petri para su solidificación luego de 30 minutos (ver anexo 3).

Con una micropipeta calibrada, se tomó 1.0 mL de la muestra homogenizada y se agregó asépticamente 0,1 mL de cada dilución en placas de agar Sabouraud solidificado y se difundió el inóculo con una varilla de vidrio estéril. Se incubó las placas por 5 días a una temperatura de 22.5°C ±2.5.

Finalmente realizó el recuento sobre placas; se reportó los resultados en unidades formadoras de colonias ufc/mL y para las placas que no tuvieron colonias, se reportó el conteo de mohos y levaduras como menor de diez.

3.5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

El presente trabajo comprende 4 etapas: diagnóstico de la situación de la empresa, demostración de la compatibilidad de la metodología basada en citometría de flujo, comprobación de la eficiencia en la detección del método y prueba final en la línea de producción. Todas estas etapas son necesarias para lograr la implementación del sistema de detección de citometría de flujo Chemunex y asimismo obtener una disminución del tiempo de resultados y consecuente liberación de los productos.

3.5.1. Diagnóstico de la situación actual de liberación de yogurt

Se llevó a cabo la evaluación a través de visitas y reuniones con personal del área de aseguramiento de la calidad de la empresa láctea ABC, para verificar que tipo de análisis realizaban para la liberación de yogurt, los flujos de trabajo y personal de trabajo asignado al proceso de análisis de muestras en el laboratorio de calidad, el número, frecuencia de análisis y las variedades de yogurt con la finalidad de evaluar la factibilidad de la empresa para la implementación del sistema de citometría de flujo y lograr las beneficios de reducción de tiempo y costos esperados.

3.5.2. Compatibilidad de los diferentes tipos de yogures con la metodología de citometría de flujo

En esta etapa consistió en verificar en tres lotes de producción la compatibilidad del producto analizado a través del protocolo para detección de levaduras en productos lácteos fermentados de Chemunex. Esta prueba se realizó para todos los productos identificados y que son analizados rutinariamente con el método alternativo.

Se colectaron tres lotes diferentes de cada producto para cada variedad de yogurt y se analizaron según el protocolo establecido, se prepararon los controles positivos y negativos y se incubaron las muestras siguiendo las recomendaciones.

Los controles positivo y negativo deben dar los resultados esperados, asimismo para considerar un producto compatible con el protocolo D Count empleado, los tres lotes diferentes deben dar un resultado verde o resultado negativo (■), equivalente en un valor menor a 100 ufc/g al quinto día de incubación en la técnica de recuento SDA.

3.5.3. Desempeño de la metodología de citometría de flujo en la detección de dos cepas de levaduras propias del yogurt

Esta etapa consistió en inocular dos cepas de levadura contaminantes en los yogures con el fin de evaluar la eficacia de detección de la metodología implementada. Además, los 38 diferentes yogures identificados fueron agrupados en “familias”, tomando en cuenta su variedad y características similares.

La eficacia de la metodología fue comprobada con el análisis de dos cepas de levaduras características contaminantes de yogurt: *Rhodotorula mucilaginosa* y *Torulospora delbreueckii*. Se prepararon suspensiones de cada microorganismo a una concentración final de 10ufc/ml de agua peptonada tamponada. Posteriormente, se inoculó 1ml de la suspensión en a) un tubo de caldo estéril y b) tres envases de producto de cada “familia” por cada microorganismo, realizando un control de nivel de contaminación por el método de referencia en SDA por triplicado, tanto para el tubo como para cada uno de los envases. Se

incubó cada producto a $27.5^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 30 horas para el método de citometría de flujo y por 5 días a $22.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5$ para el SDA y finalmente se analizaron los resultados.

3.5.4. Validación del método

En esta etapa se validó la funcionalidad del método de citometría de flujo aplicado directamente en las diferentes líneas de producción. El objetivo de esta prueba es verificar que el método alternativo de resultados similares cuando lo comparamos con el método de referencia en presencia del producto. Esta prueba fue realizada para todos los productos que son analizados rutinariamente con el método alternativo. Se realizó el análisis a un total de mil muestras de las diferentes líneas de producción de yogurt, asimismo se realizaron los análisis en paralelo con la metodología de referencia SDA.

3.6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los controles positivos y negativos deben dar los resultados esperados.

Para considerar que ambos métodos son equivalentes, el porcentaje de concordancia: $(\text{TN} + \text{TP}) / (\text{TN} + \text{TP} + \text{ND} + \text{PD})$ entre los dos métodos debe ser mínimo 90%

Donde:

TN: True Negative (Cuando coincide el resultado negativo para ambos métodos)

TP: True Positive (Cuando coincide el resultado positivo para ambos métodos)

ND: Negative Deviation (Cuando D Count indica negativo y en la tradicional positivo)

PD: Positive Deviation (Cuando D Count indica positivo y en la tradicional negativo)

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de las cuatro etapas propuestas para la implementación de la metodología de citometría de flujo Chemunex con el sistema D Count 25 en la línea de yogurt de la empresa láctea ABC.

4.1. DIAGNÓSTICO DE LA SITUACIÓN ACTUAL: LIBERACIÓN DE YOGURT

En esta etapa se llevaron a cabo reuniones con la superintendencia y jefatura de calidad, donde se recopiló información sobre el laboratorio, el personal, los horarios, flujo de trabajo, número de muestras, variedades de yogurt elaborados y metodología de análisis empleada para la detección de hongos y levaduras. La información se puede observar en la tabla 4.

Tabla 4: Información Laboratorio de Calidad

| Laboratorio de Control de Calidad Empresa ABC | |
|--|--|
| Superintendente de calidad | C.M |
| Jefe de calidad | I.S. |
| Analistas | 3 analistas |
| Horarios de trabajo | 6 am a 6pm de lunes a sábado |
| Turnos de trabajo | 2 turnos de trabajo de 6am a 2pm y de 10 am a 6pm. 2 analistas en el primer turno y 1 en el segundo. |
| Variedades de yogurt | 38 tipos de yogurt |
| Numero de muestras analizadas | 60 análisis por día |
| Metodología de análisis de hongos y levaduras | Recuento en placa sabouraud dextrosa agar (SDA) |
| Tiempo de resultado para liberación | 5 días |
| Cuentan con cámara de incubación | No |
| Cuentan con sala de siembra | Si |
| Cuentan campana de siembra | Si |

Se puede evidenciar que la empresa láctea ABC contaba con infraestructura, personal y controles de aseguramiento de la calidad adecuados, asimismo se realizaban altos volúmenes de producción, así como gran número de variedades y presentaciones de yogurt, lo que exigía de un alto número de análisis microbiológicos diarios. Todo lo mencionado anteriormente hacían de la empresa en estudio una excelente candidata para la implementación de la metodología automatizada Chemunex de citometría de flujo.

Cabe resaltar que paralelamente se realizó un estudio financiero del retorno de la inversión (ROI) sobre el equipamiento del sistema de citometría de flujo Chemunex, para lo cual se solicitó información adicional como volúmenes de producción, costos de almacenamiento, costos y número de análisis entre otros. Con esta información se obtiene la gráfica donde se aprecia en color rojo el costo total de la inversión en el equipamiento y en color azul se ven los ahorros a obtener si es correctamente implementado. Podemos observar que a partir del tercer mes de operación del sistema se logra la recuperación de la inversión y en los meses sucesivos se obtienen ahorros acumulados (color verde) principalmente debido a la disminución de los costos de almacenamiento (Ver figura 4).

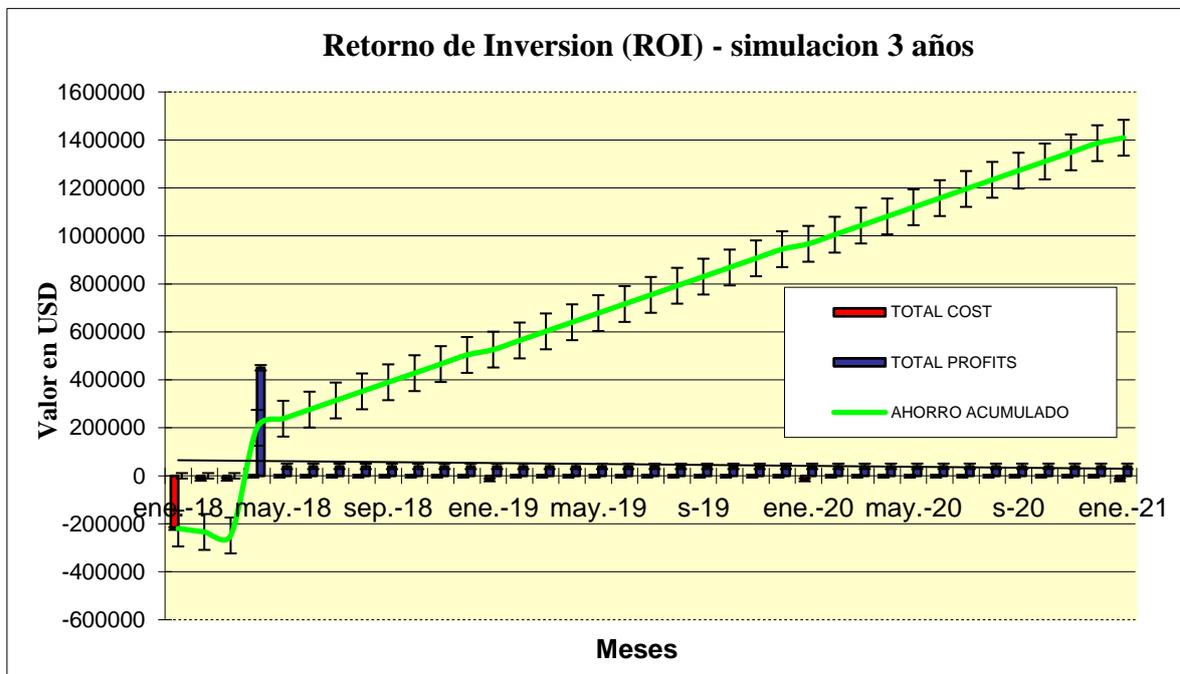


Figura 5: Análisis de retorno de la inversión D Count 25

4.2. DEMOSTRAR LA COMPATIBILIDAD DE LA METODOLOGIA APLICADA EN LOS DIFERENTES TIPOS DE YOGURT

Esta etapa sirvió para demostrar que la metodología de citometría de flujo Chemunex- D Count es compatible con las matrices evaluadas, para nuestro caso fueron los diferentes yogures evaluados (38 en total) de la empresa láctea ABC. Se obtuvo como resultado que todos los yogures analizados evaluados en tres lotes diferentes de producción dieron resultados de ausencia (color verde) de contaminación del microorganismo evaluado, indicativo de que el producto se encontró dentro de los límites microbiológicos permitidos y es apto para su consumo. Estos resultados fueron contrastados con los análisis obtenidos previamente de las mismas muestras y lotes empleando la metodología de recuento de placas con agar SDA, cuyos resultados fueron menores a 100 ufc/g para todos los análisis; valores dentro de los rangos establecidos en la norma. La tabla 5 muestra los resultados obtenidos en promedio para ambas metodologías mientras que en el anexo 4 se observa el resultado de todas las repeticiones realizadas. Con los resultados observados en la tabla 5 se comprueba que la metodología de citometría de flujo Chemunex logró un excelente desempeño para la matriz yogurt con las muestras evaluadas; Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Laplace-Builhe et al. (1993) en su investigación quien trabajó con la misma matriz.

4.3. PROBAR EL DESEMPEÑO DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA EN LA DETECCIÓN DE DOS CEPAS DE LEVADURAS PROPIAS DE YOGURT

Durante esta etapa se realizó la agrupación de los yogures elaborados por la empresa ABC tomando en cuenta su variedad y características similares con la finalidad de reducir el número de análisis. Se redujo así de 38 tipos de yogurt iniciales a 8 diferentes grupos o familias, agrupándolos a cada uno según su variedad, no se tomó en cuenta para esta agrupación; su presentación, su sabor o si contaban con adición de frutas. Esta agrupación se puede apreciar en la tabla 6.

Tabla 5: Promedio de Resultados de la prueba de Compatibilidad de Producto

| Prueba de Compatibilidad de Producto | | | | |
|---|---------------------------------|---|---|----------------------------|
| Muestra | DCount /30horas | | SDA /5dias | |
| | Resultado ⁽¹⁾ |  | Promedio ufc/g por Lote ⁽²⁾ | Desviación Standard |
| Yogurt biodefensa Fresa | Negativo |  | 11.67 | 3.51 |
| Yogurt biodefensa Vanilla/ Vanilla Light | Negativo |  | 6.00 | 2.00 |
| Yogurt biodefensa Piña | Negativo |  | 11.67 | 5.77 |
| Yogurt biodefensa Fresa Frambuesa Light | Negativo |  | 12.00 | 2.00 |
| Yogurt biodefensa Kids Uva Mora | Negativo |  | 16.33 | 5.86 |
| Yogurt biodefensa Kids Tutti Frutti | Negativo |  | 10.33 | 4.93 |
| Yogurt Niños Durazno B | Negativo |  | 11.00 | 2.00 |
| Yogurt Niños Vainilla Francesa B | Negativo |  | 15.00 | 3.61 |
| Yogurt Durazno | Negativo |  | 15.33 | 3.06 |
| Yogurt Fresa | Negativo |  | 16.67 | 6.43 |
| Yogurt Vainilla Francesa | Negativo |  | 11.33 | 6.03 |
| Yogurt Lúcumá | Negativo |  | 14.00 | 8.72 |
| Yogurt Guanábana | Negativo |  | 22.00 | 6.93 |
| Yogurt Mora | Negativo |  | 18.00 | 5.00 |
| Yogurt Guindón | Negativo |  | 20.67 | 6.11 |
| Yogurt Granadilla Linaza | Negativo |  | 16.33 | 5.86 |
| Yogurt Ciruela Linaza | Negativo |  | 13.67 | 5.69 |
| Yogurt Plátano | Negativo |  | 14.67 | 3.06 |
| Yogurt Coco | Negativo |  | 11.33 | 5.03 |
| Yogurt Piña Colada | Negativo |  | 10.67 | 1.53 |
| Yogurt Natural | Negativo |  | 8.67 | 3.06 |
| Yogurt 0% Lactosa Piña Familiar | Negativo |  | 10.00 | 5.29 |
| Yogurt MD Vainilla Francesa | Negativo |  | 12.00 | 1.00 |
| Yogurt Griego Durazno | Negativo |  | 25.00 | 4.36 |
| Yogurt Griego Blueberry | Negativo |  | 16.67 | 4.16 |
| Yogurt Griego Fresa 0% Grasa | Negativo |  | 23.67 | 7.64 |
| Yogurt Griego 0% Grasa Natural | Negativo |  | 17.00 | 5.57 |
| Yogurt Niños Durazno | Negativo |  | 16.67 | 6.43 |
| Yogurt Niños Vainilla Francesa | Negativo |  | 15.00 | 4.58 |
| Yogurt Niños Fresa | Negativo |  | 9.67 | 3.21 |
| Yogurt Mix Fresa | Negativo |  | 14.00 | 6.08 |
| Yogurt Mix Vainilla Yopi | Negativo |  | 12.00 | 3.61 |
| Yogurt Yopi Fresa | Negativo |  | 18.33 | 5.69 |
| Leche Cultivada | Negativo |  | 18.33 | 5.69 |
| Yogurt Biofrutado Cocktail Frutas Vaso | Negativo |  | 16.33 | 5.51 |
| Yogurt Biofrutado Fresa | Negativo |  | 14.67 | 4.73 |
| Yogurt Biofrutado Piña Linaza Vaso | Negativo |  | 20.67 | 7.02 |
| Yogurt Biofrutado Durazno Vaso | Negativo |  | 14.33 | 4.93 |

(1) Resultado de tres repeticiones.

(2) Promedio de tres repeticiones.

Tabla 6: Agrupación de las variedades de yogurt en la empresa ABC para la prueba de desempeño analítico

| Producto | Presentación | Observaciones | Variedades | Familias |
|---|--------------------------|--|-------------------|-----------------|
| Yogurt biodefensa Fresa | 100 mL | Misma línea de producción/sabores diferentes | 1 | 1 |
| Yogurt biodefensa Vainilla/ Vainilla Light | 100 mL | | 2 | |
| Yogurt biodefensa Piña | 100 mL | | 3 | |
| Yogurt biodefensa Fresa Frambuesa Light | 100 mL | | 4 | |
| Yogurt biodefensa Kids Uva Mora | 100 ml | | 5 | |
| Yogurt biodefensa Kids Tutti Frutti | 100 ml | | 6 | |
| Yogurt Niños Durazno B | 100 ml | | 7 | |
| Yogurt Niños Vainilla Francesa B | 100 ml | | 8 | |
| Yogurt Durazno | 946 ml/ 1.8L/180 ml/340g | Texturas similares/ Diferentes sabores | 9 | 2 |
| Yogurt Fresa | 946 ml/ 1.8L/180 ml/340g | | 10 | |
| Yogurt Vainilla Francesa | 946 ml/ 1.8L/180 ml/340g | | 11 | |
| Yogurt Lúcuma | 946 ml/ 1.8L | | 12 | |
| Yogurt Guanábana | 946 ml/ 1.8L | | 13 | |
| Yogurt Mora | 946 ml | | 14 | |
| Yogurt Guindón | 946 ml | | 15 | |
| Yogurt Granadilla Linaza | 946 ml | | 16 | |
| Yogurt Ciruela Linaza | 946 ml | | 17 | |
| Yogurt Plátano | 946 ml | | 18 | |
| Yogurt Coco | 946 ml | | 19 | |
| Yogurt Piña Colada | 946 ml | | 20 | |
| Yogurt Natural | 946 ml | | 21 | |
| Yogurt 0% Lactosa Piña Familiar | 946 mL | | 22 | |
| Yogurt MD Vainilla Francesa | 946 ml | Producto diferente | 23 | 3 |
| Yogurt Griego Durazno | 120 g | Textura densa/Sabores diferentes | 24 | 4 |
| Yogurt Griego Blueberry | 120 g | | 25 | |
| Yogurt Griego Fresa 0% Grasa | 120 g/500 g | | 26 | |
| Yogurt Griego 0% Grasa Natural | 500 g | | 27 | |

<<Continuación>>

| | | | | |
|---|------------|--|----|---|
| Yogurt Niños Durazno | 100 ml | Misma línea de producción/sabores | 28 | 5 |
| Yogurt Niños Vainilla Francesa | 100 ml | | 29 | |
| Yogurt Niños Fresa | 120 g | | 30 | |
| Yogurt Mix Fresa | 125 g | Textura similar | 31 | 6 |
| Yogurt Mix Vainilla Yopi | 125g/ 100g | | 32 | |
| Yogurt Yopi Fresa | 125 g | | 33 | |
| Leche Cultivada | 800 g | Producto diferente | 34 | 7 |
| Yogurt Biofrutado Cocktail Frutas Vaso | 140 ml | Misma línea de producción/sabores diferentes | 35 | 8 |
| Yogurt Biofrutado Fresa | 140 ml | | 36 | |
| Yogurt Biofrutado Piña Linaza Vaso | 140 ml | | 37 | |
| Yogurt Biofrutado Durazno Vaso | 140 ml | | 38 | |

Además, se demostró la eficiencia de la metodología de citometría de flujo en la detección de dos cepas de levadura características: *Rhodotorula mucilaginosa* y *Torulospora delbreueckii*. El resultado de detección obtenido en el sistema D Count fue positivo (color rojo) detectando la contaminación para el nivel de concentración de levaduras inoculadas para las muestras analizadas por triplicado según se aprecia en detalle en el anexo 5. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos aplicando la metodología de referencia SDA, con los mismos volúmenes de suspensión y concentración del contaminante y una incubación de hasta 5 días según se puede ver en el anexo 6 y el promedio de resultados en la tabla 7.

Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Laplace et al. (1993) quienes reportan la detección de contaminación de yogurt inoculado con levadura *Sacharomyces cerevisiae* dando tiempos de detección similares a los encontrados en este estudio empleando citometría de flujo. Los resultados hallados demuestran que la citometría de flujo puede ser empleada como una herramienta predictiva para el control de calidad, ya que brindan resultados en tiempos menores que los métodos convencionales.

Tabla 7: Promedio de resultados de la Prueba de Desempeño metodología SDA

| Prueba de Desempeño Analítico | | | | | | | |
|-------------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------|---------|-------------------------|---------------------|-------------------|
| Muestra | SDA 72h | | SDA 5to día | Muestra | SDA 72h | | SDA 5to día |
| | Promedio Lotes (ufc/ml) | Desviación Standard | Promedio (ufc/ml) | | Promedio Lotes (ufc/ml) | Desviación Standard | Promedio (ufc/ml) |
| YBDF1C1 | 266.67 | 56.86 | >1000 | YNF1C1 | 180.00 | 10.00 | >1000 |
| YBDF2C1 | 306.67 | 51.32 | >1000 | YNF2C1 | 146.67 | 23.09 | >1000 |
| YBDF3C1 | 260.00 | 52.92 | >1000 | YNF3C1 | 146.67 | 23.09 | >1000 |
| YBDF1C2 | 190.00 | 55.68 | >1000 | YNF1C2 | 140.00 | 52.92 | >1000 |
| YBDF2C2 | 210.00 | 26.46 | >1000 | YNF2C2 | 116.67 | 11.55 | >1000 |
| YBDF3C2 | 203.33 | 49.33 | >1000 | YNF3C2 | 213.33 | 15.28 | >1000 |
| YF1C1 | 136.67 | 37.86 | >1000 | YMF1C1 | 143.33 | 32.15 | >1000 |
| YF2C1 | 163.33 | 25.17 | >1000 | YMF2C1 | 136.67 | 30.55 | >1000 |
| YF3C1 | 273.33 | 58.59 | >1000 | YMF3C1 | 166.67 | 15.28 | >1000 |
| YF1C2 | 166.67 | 64.29 | >1000 | YMF1C2 | 136.67 | 37.86 | >1000 |
| YF2C2 | 180.00 | 60.00 | >1000 | YMF2C2 | 150.00 | 10.00 | >1000 |
| YF3C2 | 156.67 | 58.59 | >1000 | YMF3C2 | 106.67 | 11.55 | >1000 |
| YSLV1C1 | 190.00 | 55.68 | >1000 | LC1C1 | 190.00 | 10.00 | >1000 |
| YSLV2C1 | 140.00 | 36.06 | >1000 | LC2C1 | 153.33 | 20.82 | >1000 |
| YSLV3C1 | 263.33 | 35.12 | >1000 | LC3C1 | 156.67 | 55.08 | >1000 |
| YSLV1C2 | 210.00 | 26.46 | >1000 | LC1C2 | 160.00 | 36.06 | >1000 |
| YSLV2C2 | 240.00 | 52.92 | >1000 | LC2C2 | 163.33 | 37.86 | >1000 |
| YSLV3C2 | 146.67 | 30.55 | >1000 | LC1C1 | 176.67 | 5.77 | >1000 |
| YGN1C1 | 113.33 | 50.33 | >1000 | YBFV1C1 | 233.33 | 51.32 | >1000 |
| YGN2C1 | 226.67 | 30.55 | >1000 | YBFV2C1 | 216.67 | 56.86 | >1000 |
| YGN3C1 | 163.33 | 37.86 | >1000 | YBFV3C1 | 220.00 | 10.00 | >1000 |
| YGN1C2 | 163.33 | 70.95 | >1000 | YBFV1C2 | 190.00 | 10.00 | >1000 |
| YGN2C2 | 136.67 | 37.86 | >1000 | YBFV2C2 | 186.67 | 23.09 | >1000 |
| YGN3C2 | 213.33 | 11.55 | >1000 | YBFV3C2 | 190.00 | 10.00 | >1000 |

Donde; YBDFC1 y YBDFC2 corresponden a la familia 1 YFC1 y YFC2 a la familia 2, YSLVC1 y YSLVC2 a la familia 3, YGNC1 y YGNC2 a la familia 4, YNFC1 y YNFC1 a la familia 5, YMFC1 y YMFC1 a la familia 6, LCC1 y LCC1 a la familia 7 y YBFVC1 y YBFVC1 a la familia 8.

4.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La etapa de validación del método consistió en realizar un total de mil análisis con muestras de yogurt tanto con la metodología de citometría de flujo como con la metodología tradicional SDA.

En los resultados de los análisis mostrados en la tabla 8 se obtuvo un porcentaje de concordancia de 99.68 por ciento entre la metodología alternativa de citometría de flujo y la de referencia SDA. Al obtener resultados con valores de concordancia mayores al noventa por ciento, se puede considerar que ambos métodos son equivalentes. Por lo tanto, la metodología de citometría de flujo puede ser empleada como metodología predictiva, ya que se obtienen resultados válidos en tiempos menores.

Los resultados indican que, del total de análisis, dos valores tuvieron desviación negativa y un valor tuvo desviación positiva. El primero indica que el resultado negativo con el método de citometría difiere del de la metodología.

4.5. APLICACIÓN DE LAS COMPETENCIAS PROFESIONALES

El presente Trabajo de Suficiencia Profesional describe las actividades realizadas por el Bachiller en Ciencias – Industrias Alimentarias en las empresas Química Suiza S.A. y QSI Perú S.A., desempeñando los cargos sucesivos de coordinador de línea, jefe de línea y key account manager de unidad de negocios, a cargo de la representación de los productos y equipamientos de la marca bioMerieux- Industry, empresa transnacional de origen francés dedicada al desarrollo de nuevas tecnologías para microbiología industrial. La carrera de Industrias Alimentarias permite el correcto desenvolvimiento dentro de la empresa tanto en conocimientos como en competencias adquiridas.

Durante el desempeño profesional, se realizó la implementación de distintos equipos de microbiología en empresas de alimentos de diferentes categorías. Para ello, se implementaron análisis continuos de las industrias existentes, así como de los productos

Tabla 8: Resumen de resultados Etapa de Equivalencia

| Resumen de Pruebas de Equivalencia de Producto | | | | | | | | | | |
|--|----------------|-------------|------|---|---------|-----------|------------------------|-----------|----------|----------|
| Muestra | N° de Análisis | D Count 30h | | | SDA 5d | | Análisis de Resultados | | | |
| | | Resultado | | | Prom (- | Valor (+) | TN | TP | ND | PD |
| | | (-) | ■(+) | ● |) <100 | >100 | | | | |
| Yogurt biodefensa Vanilla/ Vanilla Light | 24 | 22 | 2 | | 22 | 2 | 22 | 2 | | |
| Yogurt biodefensa Piña | 24 | 23 | 1 | | 23 | 1 | 23 | 1 | | |
| Yogurt biodefensa Fresa Frambuesa Light | 6 | 6 | 0 | | 6 | 0 | 6 | 0 | | |
| Yogurt biodefensa Kids Uva Mora | 12 | 12 | 0 | | 12 | 0 | 12 | 0 | | |
| Yogurt biodefensa Kids Tutti Frutti | 18 | 18 | 0 | | 18 | 0 | 18 | 0 | | |
| Yogurt Niños Durazno B | 30 | 29 | 1 | | 29 | 1 | 29 | 1 | | |
| Yogurt Niños Vainilla Francesa B | 15 | 15 | 0 | | 15 | 0 | 15 | 0 | | |
| Yogurt Durazno | 45 | 30 | 15 | | 30 | 15 | 30 | 15 | | |
| Yogurt Fresa | 45 | 42 | 3 | | 43 | 2 | 42 | 3 | 1 | |
| Yogurt Vainilla Francesa | 18 | 17 | 1 | | 17 | 1 | 17 | 1 | | |
| Yogurt Lúcumá | 45 | 44 | 1 | | 44 | 1 | 44 | 1 | | |
| Yogurt Guanábana | 30 | 28 | 2 | | 28 | 2 | 28 | 2 | | |
| Yogurt Mora | 30 | 28 | 2 | | 28 | 2 | 28 | 1 | | 1 |
| Yogurt Guindón | 10 | 6 | 4 | | 6 | 4 | 6 | 4 | | |
| Yogurt Granadilla Linaza | 30 | 30 | 0 | | 30 | 0 | 30 | 0 | | |
| Yogurt Ciruela Linaza | 18 | 18 | 0 | | 18 | 0 | 18 | 0 | | |
| Yogurt Plátano | 30 | 29 | 1 | | 29 | 1 | 29 | 1 | | |
| Yogurt Coco | 12 | 12 | 0 | | 12 | 0 | 12 | 0 | | |
| Yogurt Piña Colada | 6 | 6 | 0 | | 6 | 0 | 6 | 0 | | |
| Yogurt Natural | 30 | 30 | 0 | | 30 | 0 | 30 | 0 | | |
| Yogurt 0% Lactosa Piña Familiar | 30 | 28 | 2 | | 28 | 2 | 28 | 2 | | |
| Yogurt MD Vainilla Francesa | 24 | 22 | 2 | | 22 | 2 | 22 | 2 | | |
| Yogurt Griego Durazno | 30 | 29 | 1 | | 29 | 1 | 29 | 1 | | |
| Yogurt Griego Blueberry | 24 | 24 | 0 | | 24 | 0 | 24 | 0 | | |
| Yogurt Griego Fresa 0% Grasa | 18 | 18 | 0 | | 18 | 0 | 18 | 0 | | |
| Yogurt Griego 0% Grasa Natural | 24 | 24 | 0 | | 24 | 0 | 24 | 0 | | |
| Yogurt Niños Durazno | 30 | 29 | 1 | | 29 | 1 | 28 | 1 | 1 | |
| Yogurt Niños Vainilla Francesa | 30 | 30 | 0 | | 30 | 0 | 30 | 0 | | |
| Yogurt Niños Fresa | 30 | 30 | 0 | | 30 | 0 | 30 | 0 | | |
| Yogurt Mix Fresa | 30 | 30 | 0 | | 30 | 0 | 30 | 0 | | |
| Yogurt Mix Vainilla Yopi | 30 | 30 | 0 | | 30 | 0 | 30 | 0 | | |
| Yogurt Yopi Fresa | 30 | 29 | 1 | | 29 | 1 | 29 | 1 | | |
| Leche Cultivada | 30 | 29 | 1 | | 29 | 1 | 29 | 1 | | |
| Yogurt Biofrutado Cocktail Frutas Vaso | 36 | 35 | 1 | | 35 | 1 | 35 | 1 | | |
| Yogurt Biofrutado Fresa | 36 | 36 | 0 | | 36 | 0 | 36 | 0 | | |
| Yogurt Biofrutado Piña Linaza Vaso | 30 | 30 | 0 | | 30 | 0 | 30 | 0 | | |
| Yogurt Biofrutado Durazno Vaso | 30 | 30 | 0 | | 30 | 0 | 30 | 0 | | |
| N° de Análisis Total | 970 | | | | | | 927 | 41 | 2 | 1 |

elaborados y de los procesos que conllevan a la fabricación de estos. Esto con el fin de identificar los puntos críticos de control y los análisis microbiológicos que se requiere para su liberación al mercado. Para la realización de estas funciones se pusieron en práctica los conocimientos adquiridos durante los años de estudio, tal como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Cursos y conocimientos adquiridos y aplicados en el desempeño laboral

| Cursos | Conocimientos adquiridos puestos en práctica |
|--------------------------------|---|
| Microbiología de los alimentos | Métodos de control microbiológico |
| Análisis de Alimentos | Metodologías de análisis de alimentos |
| Industrias cárnicas | Elaboración de productos cárnicos |
| Industrias lácteas | Elaboración de productos lácteos |
| Control de calidad | Identificación de puntos críticos de control |

Asimismo, para el presente Trabajo de Suficiencia Profesional se realizó la aplicación de una metodología de identificación microbiana en una empresa láctea, aplicando conocimientos específicos de identificación y detección de microorganismos, elaboración y control de calidad de derivados lácteos, que guardan relación con las asignaturas mostradas en la Tabla 10.

Tabla 10. Cursos y conocimientos adquiridos y aplicados en el control de calidad de los yogurts analizados en la empresa láctea ABC.

| Cursos | Conocimientos adquiridos puestos en práctica |
|--------------------------------|---|
| Tecnología de Alimentos I | Conservación y procesamiento de alimentos |
| Análisis de Alimentos | Metodologías de análisis de alimentos |
| Microbiología de los alimentos | Métodos de control microbiológico |
| Tecnología de leche | Características fisicoquímicas de la leche |
| Industrias lácteas | Elaboración de productos lácteos |

Finalmente, el desarrollo de capacidades y competencias durante la carrera, tales como trabajo en equipo, búsqueda y redacción apropiada de información técnico-científica, comunicación, empatía y responsabilidad en el trabajo, entre otros, permitió un correcto desenvolvimiento del bachiller en el centro laboral, así como en la ejecución exitosa de las labores y actividades encomendadas

V. CONCLUSIONES

1. La implementación de la metodología de citometría de flujo logró una reducción del tiempo de liberación del yogurt al mercado desde 5 días iniciales a 30 horas para todas las variedades evaluadas.
2. Se comprobó que la empresa contaba con instalaciones y personal calificado, asimismo con un volumen de producción y metodologías de análisis adecuadas para realizar la implementación de la metodología automatizada de citometría de flujo Chemunex D Count.
3. Los 38 diferentes tipos de yogures evaluados en la empresa láctea ABC fueron compatibles con la metodología de citometría de flujo D Count, para su procedimiento de detección de levaduras en productos lácteos fermentados.
4. Se comprobó la eficacia de la metodología de citometría de flujo en la detección de 02 cepas características inoculadas con un tiempo de incubación de 30 horas en los 8 grupos representativos de yogurt evaluados.
5. Se validó que el método alternativo de citometría de flujo es equivalente al método tradicional Sabouraud Dextrosa Agar para el protocolo de detección de levaduras en productos lácteos fermentados obteniéndose un porcentaje de concordancia de 99.68 por ciento en los resultados de ambas metodologías.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios posteriores para probar reducir los tiempos de liberación de yogurt hasta 24 horas como se reporta algunos usuarios de esta metodología para sus productos de leches fermentadas.
- Se recomienda realizar un estudio para buscar ahorro de tiempos de liberación implementando la metodología de citometría de flujo Chemunex para otros productos que maneja la empresa ABC tales como leche UHT y jugos en Tetrapack.
- Realizar un estudio para relacionar el número de ufc hallado con el método tradicional y los counts que reporta el equipo de tal forma de personalizarlo a los productos en estudio.

VII. BIBLIOGRAFIA

BioMerieux SA. (2016). Manual del Usuario Chemunex D-Count 25 - BioMerieux Industry. 33(477), 1–71.

BioMerieux (2018). IND43_Rev 3 Lesson 1 - Chemunex D-Count Technology – General Presentation.

Becton Dickinson BD (2015). BBL Sabouraud Dextrose Agar - BBL Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol.

Recuperado de <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=21188>

Codex Alimentarius 2011. Norma del Codex para Leches fermentadas Codex Stan 243-2003. Chemunex D Count Technology (2018). General Presentation

Díaz, M.; Herrero, M.; García, L.A.; Quirós, C. (2010) Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 48: 345-407. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.007>

FDA (2001) Molds & Mycotoxins, Enumeration of Yeast and Molds in food Dilution Plating Technique BAM-FDA. Recuperado de <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins>

Fernández, D. N.; Hernández G. E. (2006). Métodos de ensayos rápidos de detección de microorganismos en la leche. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 7 (7). Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63612753003>

- Laguado J. (2007). Aplicaciones de la Citometría de Flujo en Microbiología, Veterinaria y Agricultura. Revista MVZ Córdoba, 12 (2). Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/mvz/v12n2/v12n2a15.pdf>
- Laplace-Builhé, C; Hahne, K; Hunger, W; Tirilly, Y; Drocourt, J.L. (1993) Application of flow cytometry to rapid microbial analysis in food and drinks industries. *Bio Cell* 78: 123-128. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(93\)90122-U](https://doi.org/10.1016/0248-4900(93)90122-U)
- Macey M.G. (2007). Principles of Flow Cytometry, En M. Macey (Eds.) Flow Cytometry Principles and Application (p. 1-15) New Jersey, USA. Humana Press.
- MINAGRI. (2017) Decreto Supremo N°007-2017-MINAGRI. Decreto supremo que aprueba el reglamento de la leche y productos lácteos.
- MINSA. (2008). NTS N° 071 MINSA/DIGESA-V.01 Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano (p.23).
- MINSA (2009) Tablas Peruanas de Composición de Alimentos – INS. Recuperado de <http://www.digesa.minsa.gob.pe/NormasLegales/Normas/RM591MINSANORMA.pdf>
- Moreno-Ortiz, M. (2008). Centro Nacional de Biotecnología - Servicio de Citometría de Flujo. Recuperado de <http://wwwuser.cnb.csic.es/~citometria/index.html>
- Romero R.; Mestres J. (2004). Productos Lácteos. Tecnología. Editorial Universidad Politécnica de Cataluña. UPC.
- Taitt, C.R.; North, S. H.; (2015) High Throughput Screening for Food Safety Assessment Chapter 8: Flow cytometry and pathogen screening in foods Woodhead US Naval Research Laboratory, Washington, DC, USA.

Valdés, B. E. (2007). Aplicación de diferentes técnicas analíticas para evaluar la contaminación fúngica de alimentos y superficies. Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Vallejo, F.; Toro, M.A. (2002) Análisis Microbiológico en Yogurt con Probióticos. Boletín Micológico 17: 15-19. Recuperado de <https://simularevistas2.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/download/435/397>

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL SISTEMA D COUNT 25

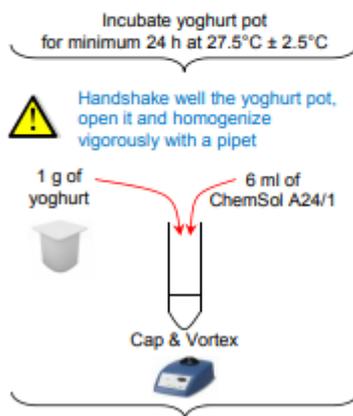
| D-Count [®] results | Sample results |
|---|--|
|  | Analysis not performed. |
|  | Negative result. |
|  | Positive result: The sample contained at least 1 targeted microorganism before incubation. |
|  | An error occurred during the sample analysis.  Refer to the D-Count [®] User manual (ref. 161150-630-A or later version) for more information. |

ANEXO 2

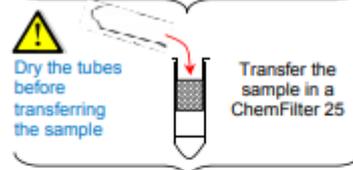
PROCEDIMIENTO BIOMERIEUX 403 D711-02 DETECCION DE LEVADURAS EN PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS



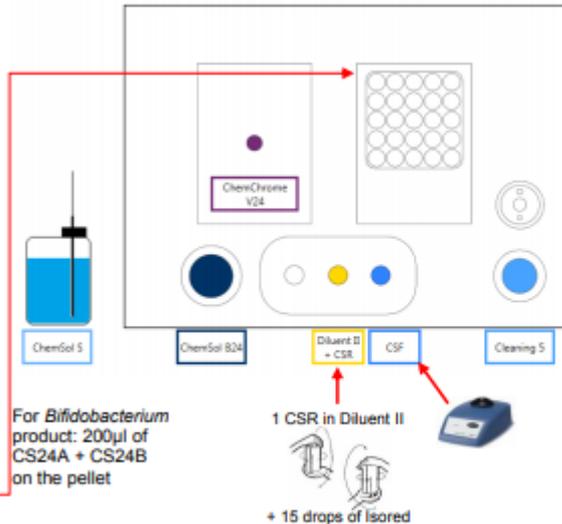
Yeast detection in fermented milk product



| Reagents: | | |
|------------------------|---------------------|--|
| ChemSol S | 418428 | Sheath fluid |
| Or ChemSol S 50x | 418521 | Sheath fluid |
| ChemSol S/1 Supplement | 421277 | Sheath fluid |
| ChemSol A24/1 | 306-R2066-01 | Solubilization buffer |
| ChemSol B24 | 418429 | Labeling buffer |
| ChemChrome V24 | 406-R1001-01 | Labeling substrate |
| CSF | 406-R4082-01 | Auto-fluorescence reducer |
| CSD | 306-R4112-01 | Make products soluble |
| CS24 kit (optional) | 303-R4111-01 | Elimination of <i>Bifidobacterium</i> interference |
| CSR12 | 312-R4095-01 | Reducing powder |
| Diluent II | 306-R3085-01 | Diluent for CSR |
| Isored | 301-R3079-01 | Prevent oxidation |
| Cleaning 5 | 306-R3107-02 | Inter analysis cleaning |
| Antifoam | 301-R3101-01 | Prevent foam in waste bottles |
| Cleaning 3 | 418427 | Cleaning solution |
| Consumables: | | |
| 20 mL tubes | 300-C1013-02 | Sampling tube |
| Stoppers 20 mL | 300-C1012-01 | Caps for 20 mL tubes |
| ChemFilter 25 | 300-C2004-01 | 25µm Filter |
| ChemFilter D17 | 300-C2003-02 | Filter for sheath bottle |



! Sample must not wait more than 20 minutes in the rack incubation before launching the batch.



ANEXO 3

FICHA TECNICA AGAR SABOURAUD DEXTROXA BD



BBL Sabouraud Dextrose Agar



BBL Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol

L007492 • Rev. 12 • Octubre 2015

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD (Opcionales)

I INTRODUCCION

Sabouraud Dextrose Agar (agar dextrosa Sabouraud) es un medio no selectivo para el cultivo y mantenimiento de hongos patógenos y no patógenos, en especial dermatofitos. Se logra selectividad mediante la adición de cloranfenicol.

II REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

1. Licuar Sabouraud Dextrose Agar Deep en tubos A mediante ebullición en baño María.* Enfriar a 45 – 50 °C y verter en placas de Petri y dejar solidificar durante como mínimo 30 min.
***NOTA:** No se recomienda utilizar un horno de microondas.
2. Inocular muestras representativas con los cultivos enumerados a continuación.
 - a. Extender en la superficie de agar 0,01 mL de asa calibrada utilizando cultivos de caldo fúngicos (hasta 7 días de antigüedad). Para *Escherichia coli*, inocular un asa llena utilizando un cultivo de caldo de soja **Trypticase** de 18 a 24 h diluido en proporción 10⁻¹.
 - b. Incubar los recipientes de prueba a 25 – 30 °C en una atmósfera aerobia. Las tapas deben estar flojas en los medios en los tubos y frascos.
 - c. Incluir agares inclinados de Sabouraud Dextrose Agar en calidad de controles no selectivos cuando se analice Sabouraud Dextrose Agar con medios con cloranfenicol.
NOTA: Trabajar con *A. brasiliensis* (ATCC 16404) en una cabina de seguridad biológica.
3. Examinar los recipientes durante un máximo de 7 días para ver si presentan crecimiento y pigmentación y en busca de selectividad en el medio con cloranfenicol.
4. Resultados previstos

Para Sabouraud Dextrose Agar

Organismos de control CLSI (cepas ATCC)

- **Candida albicans* (60193)..... Crecimiento a las 72 h
**Trichophyton mentagrophytes* (9533) Crecimiento a las 72 h

Para Sabouraud Dextrose Agar con cloranfenicol

- **Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 Crecimiento
**Candida albicans* ATCC 10231 Crecimiento
**Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9633 Crecimiento
**Escherichia coli* ATCC 25922 Inhibición (parcial a completa)
*Cepa de organismo recomendada para control de calidad del usuario.

III CONTROL DE CALIDAD ADICIONAL

1. Examinar los tubos o frascos como se describe en la sección "Deterioro del producto".
2. Examinar visualmente los tubos o frascos representativos para asegurarse de que los defectos físicos existentes no interfieran con el uso.
3. Determinar el pH potenciométricamente a temperatura ambiente para verificar el cumplimiento de la especificación de 5,6 ± 0,2.
4. Incubar tubos o frascos representativos sin inocular a una temperatura de 20 – 25 °C y 30 – 35 °C y examinar después de 7 días en busca de contaminación microbiana.

INFORMACION DEL PRODUCTO

IV USO PREVISTO

Sabouraud Dextrose Agar se utiliza en procedimientos cualitativos para cultivo de dermatofitos. Se incrementa la selectividad del medio para hongos mediante la adición de cloranfenicol.

V RESUMEN Y EXPLICACION

Sabouraud Dextrose Agar es un medio de propósito general diseñado por Sabouraud para el cultivo de dermatofitos¹. Un bajo pH (de 5,6 aproximadamente) favorece el crecimiento de hongos, en especial los dermatofitos, con efecto ligeramente inhibitorio para las bacterias contaminantes en muestras clínicas^{2,4}. La adición de cloranfenicol es una modificación diseñada para aumentar la inhibición bacteriana y posibilitar el aislamiento de muestras contaminadas de hongos oportunistas que causan infecciones clínicas similares a la dermatofitosis pero sensibles a la cicloheximida incluida en algunos medios fúngicos selectivos^{3,4}.

VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Sabouraud Dextrose Agar es un medio de peptona suplementado con dextrosa para favorecer el crecimiento de hongos. Las peptonas son fuentes de factores de crecimiento nitrogenados. La dextrosa proporciona una fuente de energía para el

crecimiento de microorganismos. El cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro con efecto inhibitor para una amplia variedad de bacterias gram negativas y positivas cuando se agrega a la fórmula.

VII REACTIVOS

Sabouraud Dextrose Agar

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

| | |
|---|--------|
| Digerido pancreático de caseína | 5,0 g |
| Digerido péptico de tejido animal | 5,0 g |
| Dextrosa | 40,0 g |
| Agar | 15,0 g |

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol contiene 0,05 g de cloranfenicol además de los elementos enumerados anteriormente.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Los tubos con tapas ajustadas deben abrirse con cuidado para evitar lesiones por la rotura del vidrio.

En las muestras clínicas puede haber microorganismos patógenos, como los virus de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales deben seguirse las "Precauciones estándar"^{28,29} y las directrices del centro. Después de su utilización, los tubos preparados, los recipientes de muestras y otros materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser desechados.

Instrucciones para el almacenamiento

Al recibir los tubos, almacenarlos en un lugar oscuro a 2 – 8 °C. No congelar ni sobrecalentar. No abrir hasta que se vayan a utilizar. Reducir al mínimo la exposición a la luz. Los medios en tubos almacenados como se indica en sus etiquetas hasta momentos antes de su utilización pueden ser inoculados hasta la fecha de caducidad e incubados durante los periodos de incubación recomendados (un máximo de 6 semanas para los medios micológicos). Dejar que el medio se caliente a temperatura ambiente antes de la inoculación.

Deterioro del producto

No utilizar los tubos si muestran evidencia de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación o cualquier otro signo de deterioro.

VIII RECOGIDA Y MANIPULACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras adecuadas para cultivo pueden manipularse mediante diversas técnicas. Para obtener información detallada, consultar los textos correspondientes^{30,31}. Las muestras deben obtenerse antes de administrar los agentes antimicrobianos. Deben adoptarse las medidas necesarias para un transporte inmediato al laboratorio.

IX PROCEDIMIENTO

Material suministrado

Sabouraud Dextrose Agar o

Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol

Materiales necesarios pero no suministrados

Medios de cultivo auxiliar, reactivos, organismos para el control de calidad y el equipo de laboratorio que se requiera.

Procedimiento de análisis

Emplear técnicas asépticas.

Licuar el agar contenido en los tubos A mediante ebullición en baño María*, dejar enfriar a 45 – 50 °C y verter en placas de Petri. Dejar solidificar durante el menos 30 min.

Con placas y frascos, extender la muestra tan pronto como sea posible después de recibirla en el laboratorio, mediante un asa de inoculación estéril para obtener colonias aisladas. Consultar las referencias correspondientes para obtener información acerca del procesamiento e inoculación de muestras^{3,4}.

Los agares inclinados en tubo preparados están diseñados para uso con cultivos puros con fines de mantenimiento y otros propósitos.

Los medios pueden inocularse hasta la fecha de caducidad e incubarse durante un máximo de 6 semanas.

Para el aislamiento de hongos de muestras potencialmente contaminadas, se debe inocular un medio selectivo junto con uno no selectivo. Incubar los recipientes a 25 – 30 °C con mayor humedad. Todos los cultivos deben examinarse al menos una vez por semana para ver si presentan crecimiento fúngico y deben mantenerse durante 4 – 6 semanas antes de ser interpretados como negativos.

*NOTA: No se recomienda utilizar un horno de microondas.

Control de calidad del usuario

Véase "Procedimientos de control de calidad".

Cada lote de medios se ha probado con los microorganismos de control de calidad adecuados mediante una prueba que cumple las especificaciones del producto y los criterios aplicables del CLSI. Como siempre, las pruebas de control de calidad se deben llevar a cabo conforme a la normativa local, estatal, federal o nacional aplicable, a los requisitos de los organismos de acreditación y/o a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio.

Se debería utilizar un electrodo suficientemente pequeño como para entrar en los tubos para determinar el pH potenciométricamente de los medios en tubos, frascos y medios **Mycoflask**. En los medios sólidos o semisólidos, la punta del electrodo debería estar colocada en la parte central de la masa de agar.

X RESULTADOS

Después de una incubación suficiente, los recipientes deben mostrar colonias aisladas en áreas extendidas y crecimiento confluyente en áreas de inoculación densa.

Puede ser necesario transferir el crecimiento de los agares inclinados a medios en placa para obtener cultivos puros de hongos.

Examinar los recipientes para ver si presentan colonias de hongos con morfología típica microscópica y de colonias^{4,12}. Las pruebas bioquímicas y procedimientos serológicos deben realizarse para confirmar los hallazgos.

XI LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Es posible que algunos hongos (por ejemplo, *Blastomyces dermatitidis*) no se recuperen en este medio debido al alto contenido de carbohidratos¹³.

Para su identificación, los organismos deben encontrarse en un cultivo puro. Deben llevarse a cabo pruebas morfológicas, bioquímicas y/o serológicas para lograr una identificación final. Consultar los textos correspondientes para obtener información detallada y procedimientos recomendados^{10,11}.

XII CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sabouraud Dextrose Agar

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de recipientes de Sabouraud Dextrose Agar se someten a prueba para determinar sus características de rendimiento. Mediante un asa calibrada de 0,01 mL, se inoculan muestras representativas del lote con cultivos de caldo fúngicos recientes de *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533) y *Candida albicans* (ATCC 60193). Se efectúa la lectura de los recipientes para ver si presentan crecimiento y pigmentación de colonias después de 2, 5 y 7 días de incubación a 25 – 30 °C. *C. albicans* presenta crecimiento entre medio y denso, con colonias de color blanco a blanco grisáceo. *T. mentagrophytes* presenta un crecimiento de promedio a denso, con colonias de color blanco a blanco grisáceo/marrón claro.

Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol se someten a prueba para determinar sus características de rendimiento. Mediante un asa calibrada de 0,01 mL, se inoculan muestras representativas del lote con cultivos en caldo fúngicos recientes de *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533), *Candida albicans* (ATCC 60193), *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) y cultivo de caldo de soja **Trypticase** de *Escherichia coli* (ATCC 25922). Se efectúa la lectura de los recipientes para ver si presentan crecimiento y pigmentación de colonias después de 2, 5 y 7 días de incubación a 25 – 30 °C. *C. albicans* presenta crecimiento entre medio y denso, con colonias de color blanco a blanco grisáceo. *T. mentagrophytes* presenta crecimiento de promedio a denso, con colonias de color blanco a blanco grisáceo/marrón claro. *A. brasiliensis* presenta crecimiento de medio a denso, con colonias de color marrón a negro. El crecimiento de *E. coli* es leve o está completamente inhibido.

XIII DISPONIBILIDAD

| Nº de cat. | Descripción |
|------------|---|
| 221012 | BD BBL Sabouraud Dextrose Agar Slants, pqt. de 10 tubos de tamaño A |
| 221013 | BD BBL Sabouraud Dextrose Agar Slants, caja de 100 tubos de tamaño A |
| 296182 | BD BBL Sabouraud Dextrose Agar Deeps (Pour Tubes), 20 mL, caja de 100 tubos de tamaño A |
| 221136 | BD BBL Sabouraud Dextrose Agar, frascos Mycoflask , pqt de 10 |
| 221825 | BD BBL Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol Slants, caja de 100 tubos de tamaño A |
| 221314 | BD BBL Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol, frascos Mycoflask , pqt. de 10 |

XIV BIBLIOGRAFÍA

1. Sabouraud, R. 1892. Contribution a l'etude de la trichophytie humaine. Etude clinique, microscopique et bacteriologique sur la pluralite des trichophytions de l'homme. Ann. Dermatol. Syphl. 3:1061-1087.
2. Ajello, L., L.K. Georg, W. Kaplan, and L. Kaufman. 1963. CDC laboratory manual for medical mycology. PHS Publication No. 994, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
3. Haley, L.D., J. Trandel, and M.B. Coyle. 1980. Cumitech II. Practical methods for culture and identification of fungi in the clinical microbiology laboratory. Coordinating ed., J.C. Sherris. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
4. Kane, J., and R.C. Summerbell. 1999. *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, and agents of superficial mycoses, p. 1275-1294. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. Lorian, V. (ed.) 1991. Antibiotics in laboratory medicine, 3rd ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
7. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect. Control Hospital Epidemiol. 17:53-80.
8. U.S. Department of Health and Human Services. 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 5th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
9. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.

10. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenenbaum (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
11. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
12. Larone, D.H. 1995. Medically important fungi: a guide to identification, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
13. Flores, M., and D. Welch. 1992. Mycology. Culture media, p. 6.7.1-6.7.3. In H.D. Isenberg (ed.), Clinical microbiology procedures handbook, vol.1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Servicio técnico de BD Diagnostics: póngase en contacto con el representante local de BD o visite www.bd.com/ds.



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo, and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2015 BD

ANEXO 4

RESULTADOS DE LA ETAPA DE COMPATIBILIDAD DE PRODUCTO

| Prueba de Compatibilidad de Producto | | | | | | | | |
|--|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------------|---------------------|
| Muestra | D Count 30h | | | SDA 5d | | | | |
| | Lote 001 | Lote 002 | Lote 003 | Lote 001 | Lote 002 | Lote 003 | Promedio Lotes | Desviacion Standard |
| Yogurt biodefensa Fresa | Negativo | Negativo | Negativo | 12 | 8 | 15 | 11.67 | 3.51 |
| Yogurt biodefensa Vainilla/ Vainilla Light | Negativo | Negativo | Negativo | 8 | 6 | 4 | 6.00 | 2.00 |
| Yogurt biodefensa Piña | Negativo | Negativo | Negativo | 5 | 15 | 15 | 11.67 | 5.77 |
| Yogurt biodefensa Fresa Frambuesa Light | Negativo | Negativo | Negativo | 12 | 10 | 14 | 12.00 | 2.00 |
| Yogurt biodefensa Kids Uva Mora | Negativo | Negativo | Negativo | 12 | 14 | 23 | 16.33 | 5.86 |
| Yogurt biodefensa Kids Tutti Frutti | Negativo | Negativo | Negativo | 8 | 16 | 7 | 10.33 | 4.93 |
| Yogurt Niños Durazno B | Negativo | Negativo | Negativo | 11 | 9 | 13 | 11.00 | 2.00 |
| Yogurt Niños Vainilla Francesa B | Negativo | Negativo | Negativo | 12 | 19 | 14 | 15.00 | 3.61 |
| Yogurt Durazno | Negativo | Negativo | Negativo | 16 | 12 | 18 | 15.33 | 3.06 |
| Yogurt Fresa | Negativo | Negativo | Negativo | 14 | 24 | 12 | 16.67 | 6.43 |
| Yogurt Vainilla Francesa | Negativo | Negativo | Negativo | 12 | 5 | 17 | 11.33 | 6.03 |
| Yogurt Lúcumá | Negativo | Negativo | Negativo | 4 | 20 | 18 | 14.00 | 8.72 |
| Yogurt Guanábana | Negativo | Negativo | Negativo | 14 | 26 | 26 | 22.00 | 6.93 |
| Yogurt Mora | Negativo | Negativo | Negativo | 13 | 23 | 18 | 18.00 | 5.00 |
| Yogurt Guindón | Negativo | Negativo | Negativo | 26 | 14 | 22 | 20.67 | 6.11 |
| Yogurt Granadilla Linaza | Negativo | Negativo | Negativo | 23 | 12 | 14 | 16.33 | 5.86 |
| Yogurt Ciruela Linaza | Negativo | Negativo | Negativo | 20 | 12 | 9 | 13.67 | 5.69 |
| Yogurt Plátano | Negativo | Negativo | Negativo | 14 | 12 | 18 | 14.67 | 3.06 |
| Yogurt Coco | Negativo | Negativo | Negativo | 6 | 12 | 16 | 11.33 | 5.03 |
| Yogurt Piña Colada | Negativo | Negativo | Negativo | 11 | 12 | 9 | 10.67 | 1.53 |
| Yogurt Natural | Negativo | Negativo | Negativo | 6 | 12 | 8 | 8.67 | 3.06 |
| Yogurt 0% Lactosa Piña Familiar | Negativo | Negativo | Negativo | 8 | 6 | 16 | 10.00 | 5.29 |
| Yogurt MD Vainilla Francesa | Negativo | Negativo | Negativo | 11 | 12 | 13 | 12.00 | 1.00 |
| Yogurt Griego Durazno | Negativo | Negativo | Negativo | 22 | 30 | 23 | 25.00 | 4.36 |
| Yogurt Griego Blueberry | Negativo | Negativo | Negativo | 18 | 20 | 12 | 16.67 | 4.16 |
| Yogurt Griego Fresa 0% Grasa | Negativo | Negativo | Negativo | 22 | 32 | 17 | 23.67 | 7.64 |
| Yogurt Griego 0% Grasa Natural | Negativo | Negativo | Negativo | 23 | 16 | 12 | 17.00 | 5.57 |
| Yogurt Niños Durazno | Negativo | Negativo | Negativo | 12 | 24 | 14 | 16.67 | 6.43 |
| Yogurt Niños Vainilla Francesa | Negativo | Negativo | Negativo | 14 | 20 | 11 | 15.00 | 4.58 |
| Yogurt Niños Fresa | Negativo | Negativo | Negativo | 11 | 12 | 6 | 9.67 | 3.21 |
| Yogurt Mix Fresa | Negativo | Negativo | Negativo | 18 | 7 | 17 | 14.00 | 6.08 |
| Yogurt Mix Vainilla Yopi | Negativo | Negativo | Negativo | 9 | 11 | 16 | 12.00 | 3.61 |
| Yogurt Yopi Fresa | Negativo | Negativo | Negativo | 23 | 20 | 12 | 18.33 | 5.69 |
| Leche Cultivada | Negativo | Negativo | Negativo | 20 | 23 | 12 | 18.33 | 5.69 |
| Yogurt Biofrutado Cocktail Frutas Vaso | Negativo | Negativo | Negativo | 11 | 16 | 22 | 16.33 | 5.51 |
| Yogurt Biofrutado Fresa | Negativo | Negativo | Negativo | 13 | 11 | 20 | 14.67 | 4.73 |
| Yogurt Biofrutado Piña Linaza Vaso | Negativo | Negativo | Negativo | 20 | 28 | 14 | 20.67 | 7.02 |
| Yogurt Biofrutado Durazno Vaso | Negativo | Negativo | Negativo | 20 | 12 | 11 | 14.33 | 4.93 |

ANEXO 5

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE DESEMPEÑO ANALITICO EN EL SISTEMA CHEMUNEX

| # | Sample ID | Time | Lot Number | Sampling | Manuf | Coments | Counts/ml |
|----|-----------|----------|------------|----------|-------|---------|-----------|
| 1 | Neg Ctrl | 09:30:05 | | | | | █ |
| 2 | YBDF1C1 | 09:32:19 | | | | | ● |
| 3 | YBDF2C1 | 09:34:33 | | | | | ● |
| 4 | YBDF3C1 | 09:36:47 | | | | | ● |
| 5 | YBDF1C2 | 09:39:03 | | | | | ● |
| 6 | YBDF2C2 | 09:41:19 | | | | | ● |
| 7 | YBDF3C2 | 09:43:34 | | | | | ● |
| 8 | YF1C1 | 09:45:49 | | | | | ● |
| 9 | YF2C1 | 09:48:03 | | | | | ● |
| 10 | YF3C1 | 09:50:29 | | | | | ● |
| 11 | YF1C2 | 09:52:44 | | | | | ● |
| 12 | YF2C2 | 09:54:59 | | | | | ● |
| 13 | YF3C2 | 09:57:13 | | | | | ● |
| 14 | YSLV1C1 | 09:59:28 | | | | | ● |
| 15 | YSLV2C1 | 10:01:43 | | | | | ● |
| 16 | YSLV3C1 | 10:03:58 | | | | | ● |
| 17 | YSLV1C2 | 10:06:13 | | | | | ● |
| 18 | YSLV2C2 | 10:08:29 | | | | | ● |
| 19 | YSLV3C2 | 10:10:44 | | | | | ● |
| 20 | YGN1C1 | 10:12:58 | | | | | ● |
| 21 | YGN2C1 | 10:15:12 | | | | | ● |
| 22 | YGN3C1 | 10:17:27 | | | | | ● |
| 23 | YGN1C2 | 10:19:42 | | | | | ● |
| 24 | YGN2C2 | 10:21:56 | | | | | ● |
| 25 | Pos Ctrl | 10:24:11 | | | | | ● |

| # | Sample ID | Time | Lot Number | Sampling | Manuf | Coments | Counts/ml |
|----|-----------|----------|------------|----------|-------|---------|-----------|
| 1 | Neg Ctrl | 10:55:09 | | | | | █ |
| 2 | YGN3C2 | 10:57:24 | | | | | ● |
| 3 | YKF1C1 | 10:59:40 | | | | | ● |
| 4 | YKF2C1 | 11:01:55 | | | | | ● |
| 5 | YKF3C1 | 11:04:11 | | | | | ● |
| 6 | YKF1C2 | 11:06:26 | | | | | ● |
| 7 | YKF2C2 | 11:08:41 | | | | | ● |
| 8 | YKF3C2 | 11:10:55 | | | | | ● |
| 9 | YF2C1 | 11:13:09 | | | | | ● |
| 10 | YF3C1 | 11:15:23 | | | | | ● |
| 11 | YF1C2 | 11:17:38 | | | | | ● |
| 12 | YF2C2 | 11:19:52 | | | | | ● |
| 13 | YF3C2 | 11:22:06 | | | | | ● |
| 14 | YMF1C1 | 11:24:21 | | | | | ● |
| 15 | YMF2C1 | 11:26:37 | | | | | ● |
| 16 | YMF3C1 | 11:28:52 | | | | | ● |
| 17 | YMF1C2 | 11:31:07 | | | | | ● |
| 18 | YMF2C2 | 11:33:22 | | | | | ● |
| 19 | YMF3C2 | 11:35:37 | | | | | ● |
| 20 | LC1C1 | 11:37:53 | | | | | ● |
| 21 | LC2C1 | 11:40:08 | | | | | ● |
| 22 | LC3C1 | 11:42:23 | | | | | ● |
| 23 | LC1C2 | 11:44:39 | | | | | ● |
| 24 | LC2C2 | 11:46:54 | | | | | ● |
| 25 | Pos Ctrl | 11:49:09 | | | | | ● |

<<Continuación>>

Alerts Clean Control Analyse New Product Manage Data Settings Quit

Batch Pruebas Desempeño Analítico Date 2018-08-25 Operator Manager
Session 2018-08-25 Application DC25-A711-02 System FCI1840004FP

Data Management

| # | Sample ID | Time | Lot Number | Sampling | Manuf | Coments | Counts/ml |
|----|-----------|----------|------------|----------|-------|---------|-----------|
| 1 | Neg Ctrl | 12:02:24 | | | | | ■ |
| 2 | LC1C1 | 12:04:39 | | | | | ● |
| 3 | YBFV1C1 | 12:06:54 | | | | | ● |
| 4 | YBFV2C1 | 12:09:08 | | | | | ● |
| 5 | YBFV3C1 | 12:11:23 | | | | | ● |
| 6 | YBFV1C2 | 12:13:38 | | | | | ● |
| 7 | YBFV2C2 | 12:15:52 | | | | | ● |
| 8 | YBFV3C2 | 12:18:07 | | | | | ● |
| 9 | Pos Ctrl | 12:20:22 | | | | | ● |
| 10 | | | | | | | |
| 11 | | | | | | | |
| 12 | | | | | | | |
| 13 | | | | | | | |
| 14 | | | | | | | |
| 15 | | | | | | | |
| 16 | | | | | | | |
| 17 | | | | | | | |
| 18 | | | | | | | |
| 19 | | | | | | | |
| 20 | | | | | | | |
| 21 | | | | | | | |
| 22 | | | | | | | |
| 23 | | | | | | | |
| 24 | | | | | | | |
| 25 | | | | | | | |

User Ready²⁰⁰² CHEMUNEX D-Count 28 15:58

ANEXO 6

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE DESEMPEÑO ANALITICO PARA LA METODOLOGIA SDA

| Prueba de Desempeño Analítico | | | | |
|-------------------------------|----------|----------|----------|----------------|
| Muestra | SDA 5d | | | |
| | Lote 001 | Lote 002 | Lote 003 | Promedio Lotes |
| YBDF1C1 | 220 | 250 | 330 | 266.67 |
| YBDF2C1 | 250 | 350 | 320 | 306.67 |
| YBDF3C1 | 280 | 200 | 300 | 260.00 |
| YBDF1C2 | 180 | 250 | 140 | 190.00 |
| YBDF2C2 | 220 | 180 | 230 | 210.00 |
| YBDF3C2 | 180 | 260 | 170 | 203.33 |
| YF1C1 | 120 | 110 | 180 | 136.67 |
| YF2C1 | 160 | 190 | 140 | 163.33 |
| YF3C1 | 230 | 340 | 250 | 273.33 |
| YF1C2 | 140 | 240 | 120 | 166.67 |
| YF2C2 | 120 | 180 | 240 | 180.00 |
| YF3C2 | 90 | 200 | 180 | 156.67 |
| YSLV1C1 | 130 | 200 | 240 | 190.00 |
| YSLV2C1 | 110 | 130 | 180 | 140.00 |
| YSLV3C1 | 260 | 230 | 300 | 263.33 |
| YSLV1C2 | 230 | 220 | 180 | 210.00 |
| YSLV2C2 | 200 | 300 | 220 | 240.00 |
| YSLV3C2 | 140 | 120 | 180 | 146.67 |
| YGN1C1 | 60 | 120 | 160 | 113.33 |
| YGN2C1 | 220 | 200 | 260 | 226.67 |
| YGNBC1 | 190 | 120 | 180 | 163.33 |
| YGN1C2 | 100 | 240 | 150 | 163.33 |
| YGN2C2 | 110 | 120 | 180 | 136.67 |
| YGNBC2 | 220 | 220 | 200 | 213.33 |
| YKF1C1 | 120 | 130 | 200 | 150.00 |
| YKF2C1 | 130 | 120 | 170 | 140.00 |
| YKF3C1 | 200 | 190 | 100 | 163.33 |
| YKF1C2 | 190 | 180 | 190 | 186.67 |
| YKF2C2 | 140 | 120 | 120 | 126.67 |
| YKF3C2 | 100 | 120 | 130 | 116.67 |
| YF2C1 | 180 | 170 | 190 | 180.00 |
| YF3C1 | 160 | 120 | 160 | 146.67 |
| YF1C2 | 200 | 120 | 100 | 140.00 |
| YF2C2 | 130 | 110 | 110 | 116.67 |
| YF3C2 | 200 | 230 | 210 | 213.33 |
| YMF1C1 | 130 | 120 | 180 | 143.33 |
| YMF2C1 | 110 | 170 | 130 | 136.67 |
| YMF3C1 | 180 | 170 | 150 | 166.67 |
| YMF1C2 | 120 | 110 | 180 | 136.67 |
| YMF2C2 | 150 | 160 | 140 | 150.00 |
| YMF3C2 | 100 | 120 | 100 | 106.67 |
| LC1C1 | 200 | 180 | 190 | 190.00 |
| LC2C1 | 170 | 160 | 130 | 153.33 |
| LC3C1 | 120 | 130 | 220 | 156.67 |
| LC1C2 | 190 | 170 | 120 | 160.00 |
| LC2C2 | 180 | 120 | 190 | 163.33 |
| LC1C1 | 180 | 180 | 170 | 176.67 |
| YBFV1C1 | 220 | 190 | 290 | 233.33 |
| YBFV2C1 | 200 | 170 | 280 | 216.67 |
| YBFV3C1 | 230 | 220 | 210 | 220.00 |
| YBFV1C2 | 190 | 180 | 200 | 190.00 |
| YBFV2C2 | 160 | 200 | 200 | 186.67 |
| YBFV3C2 | 200 | 180 | 190 | 190.00 |