

**ESTUDIO COMPARATIVO EN TÉCNICAS DE RECuento RÁPIDO EN EL
MERCADO Y PLACAS PETRIFILM™ 3M™ PARA EL ANÁLISIS DE
ALIMENTOS**



**ALONSO NORE LINA XIMENA
POVEDA SANCHEZ JEIMY ALEXANDRA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**

BOGOTÁ. DICIEMBRE DE 2008

**ESTUDIO COMPARATIVO EN TÉCNICAS DE RECuento RÁPIDO EN EL
MERCADO Y PLACAS PETRIFILM™ 3M™ PARA EL ANÁLISIS DE
ALIMENTOS**

**ALONSO NORE LINA XIMENA
POVEDA SANCHEZ JEIMY ALEXANDRA**

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar el título de**

MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C
DICIEMBRE DE 2008**

**ESTUDIO COMPARATIVO EN TÉCNICAS DE RECuento RÁPIDO EN EL
MERCADO Y PLACAS PETRIFILM™ 3M™ PARA EL ANÁLISIS DE
ALIMENTOS**

**ALONSO NORE LINA XIMENA
POVEDA SANCHEZ JEIMY ALEXANDRA**

APROBADO

**Janeth Arias, Bacterióloga
Directora**

**Ruth Dallos, Microbióloga Industrial
Asesora**

**Adriana Páez, Microbióloga Industrial
Jurado**

**Dolly Valbuena, Microbióloga Industrial
Jurado**

**ESTUDIO COMPARATIVO EN TÉCNICAS DE RECuento RÁPIDO EN EL
MERCADO Y PLACAS PETRIFILM™ 3M™ PARA EL ANÁLISIS DE
ALIMENTOS**

**ALONSO NORE LINA XIMENA
POVEDA SANCHEZ JEIMY ALEXANDRA**

APROBADO

**Ingrid Schuler
Decano Académico**

**Janeth Arias, Bacterióloga
Director de Carrera**

Este trabajo de grado está dedicado a Dios,
a nuestros padres y hermanos
por el apoyo que nos han brindado siempre;
a Diego Castillo,
y a todos aquellos que nos han acompañado
en este camino haciendo posible este logro.

AGRADECIMIENTOS

A la empresa 3M Colombia S.A., División Microbiología por la financiación total del proyecto; con apoyo de la Pontificia Universidad Javeriana. Agradecemos en especial a la Microbióloga Industrial Ruth Dallos y a la Bacterióloga Janeth Arias Palacios quienes fueron la guía en cada uno de los procedimientos que se realizaron, de igual manera a las personas que tienen a cargo los laboratorios de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Básicas y al profesor Miguel Panzón quien participo en el análisis estadístico de los datos.

TABLA DE CONTENIDOS

| | Pág. |
|---|-----------|
| RESUMEN | 19 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 21 |
| 2. MARCO TEORICO Y REVISIÓN DE LITERATURA | 23 |
| 2.1 Análisis Microbiológico de Alimentos | 24 |
| 2.2 Recuento y Siembra en Profundidad y Superficie | 25 |
| 2.2.1 Recuento y Siembra en Profundidad | 25 |
| 2.2.2 Recuento y Siembra en Superficie | 25 |
| 2.3 Microorganismos Indicadores en la Industria de Alimentos | 26 |
| 2.3.1 MESÓFILOS AEROBIOS | 26 |
| 2.3.2 <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> | 28 |
| 2.3.3 COLIFORMES | 29 |
| 2.3.4 <i>Escherichia coli</i> | 31 |
| 2.3.5 HONGOS Y LEVADURAS | 33 |
| 2.3.6 <i>Staphylococcus aureus</i> | 36 |
| 2.3.7 <i>Listeria sp</i> | 39 |
| 2.4 Métodos Rápidos para la Enumeración de Microorganismos Indicadores | 44 |
| 2.4.1 Placas Petrifilm 3M™ | 45 |
| 2.4.1.1 Placas Petrifilm™ para el recuento de Mesófilos | 46 |
| 2.4.1.2 Placas Petrifilm™ para el recuento de Coliformes | 47 |
| 2.4.1.3 Placas Petrifilm™ para el recuento rápido de Coliformes | 47 |
| 2.4.1.4 Placas Petrifilm™ para recuento de <i>E. coli</i> / Coliformes | 47 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.4.1.5 | Placas Petrifilm™ para recuento de Mohos y Levaduras | 48 |
| 2.4.1.6 | Placas Petrifilm™ para el recuento de Enterobacterias | 49 |
| 2.4.1.7 | Placas Petrifilm™ Staph Express para recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> | 50 |
| 2.4.1.8 | Placas Petrifilm™ para el monitoreo de <i>Listeria</i> en ambientes | 50 |
| 2.4.2 | Placas Rida®count | 52 |
| 2.4.2.1 | Rida®count para recuento de Mesófilos aerobios | 52 |
| 2.4.2.2 | Rida®count para recuento de coliformes totales | 53 |
| 2.4.2.3 | Rida®count para recuento de <i>Escherichia coli</i> | 53 |
| 2.4.2.4 | Rida®count para recuento de Hongos y Levaduras | 53 |
| 2.4.2.5 | Rida®count para recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> | 54 |
| 2.4.2.6 | Rida®count para recuento de <i>Salmonella</i> | 54 |
| 2.4.3 | Medios cromogénicos | 54 |
| 2.4.3.1 | Chromocult <i>E. coli</i> / Coliformes Merck | 55 |
| 2.4.3.2 | Medio cromogénico <i>E. coli</i> / Coliformes OXOID | 56 |
| 2.4.3.3 | Coli ID bioMérieux | 57 |
| 2.5 | Entidades de Regulación Nacional e Internacional | 58 |
| 2.5.1 | AOAC: Association of Analytical Communities | 58 |
| 2.5.1.1 | Programa de Métodos Probados en su Desempeño | 59 |
| 2.5.1.2 | Programa de Métodos Oficiales (OMA): | 59 |
| 2.5.2 | FDA: Food and Drug Administration | 60 |
| 2.2.5.2 | Seguridad de los productos alimenticios | 60 |
| 2.2.5.3 | Seguridad de los productos alimenticios para animales de granja y los medicamentos para animales | 60 |
| 2.2.5.4 | Seguridad de productos biológicos | 61 |
| 2.2.5.5 | Aprobación de nuevas drogas | 61 |
| 2.2.5.6 | Cosméticos, colorantes y aditivos | 62 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.2.5.7 | Seguridad de los productos sanitarios | 62 |
| 2.5.3 | FSIS: Food Safety and Inspection Service | 63 |
| 2.5.3.1 | Inspección de Productos Avícolas | 63 |
| 2.5.3.2 | Medidas Higiénicas y de Aseo | 64 |
| 2.5.3.3 | Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) | 66 |
| 2.5.4 | AFNOR: Association Française de Normalisation | 67 |
| 2.5.5 | USDA: United States Department of Agriculture | 68 |
| 2.5.5.1 | El Servicio de Comercialización Agrícola | 68 |
| 2.5.5.2 | El Servicio de Investigación Agrícola | 69 |
| 2.5.5.3 | El Centro de Políticas y Promoción de la Nutrición | 69 |
| 2.5.5.4 | El Servicio Agrícola Exterior | 70 |
| 2.5.6 | APHA: American Public Health Association | 70 |
| 2.5.6.1 | Las declaraciones políticas | 71 |
| 2.5.7 | INVIMA: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. | 72 |
| 2.5.7.1 | Funciones Generales | 72 |
| 2.5.8 | ICONTEC: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. | 77 |
| 3. | FORMULACION DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN | 79 |
| 3.1 | Formulación del problema | 79 |
| 3.2 | Justificación de la investigación | 79 |
| 4. | OBJETIVOS | 82 |
| 4.1 | Objetivo General | 82 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.2 | Objetivos Específicos | 82 |
| 5. | METODOLOGÍA | 83 |
| 5.1 | Diseño de la investigación | 83 |
| 5.1.1 | Población de estudio y muestra | 83 |
| 5.2 | Métodos | 85 |
| 5.2.1 | Dilución y homogenización de las muestras | 85 |
| 5.2.2 | Recuento de Mesófilos Aerobios | 85 |
| 5.2.2.1 | Análisis Microbiológico Tradicional | 85 |
| 5.2.2.2 | Placas Petrifilm™ AC | 86 |
| 5.2.2.3 | Rida Count Aerobios | 87 |
| 5.2.3 | Recuento de Enterobacterias | 87 |
| 5.2.3.1 | Análisis Microbiológico Tradicional | 87 |
| 5.2.3.2 | Placas Petrifilm™ Enterobacterias | 88 |
| 5.2.3.3 | Rida Count Enterobacterias | 88 |
| 5.2.4 | Recuento de Coliformes | 89 |
| 5.2.4.1 | Análisis Microbiológico Tradicional | 89 |
| 5.2.4.2 | NMP de Coliformes Totales | 90 |
| 5.2.4.3 | Placas Petrifilm™ Coliformes | 91 |
| 5.2.4.4 | Rida Count Coliformes | 91 |
| 5.2.5 | Recuento de <i>Escherichia coli</i> | 92 |
| 5.2.5.1 | Análisis Microbiológico Tradicional: Ausencia/ Presencia de <i>Escherichia coli</i> | 92 |
| 5.2.5.2 | Análisis Microbiológico para <i>E. coli</i> empleando Medios de cultivo cromogénicos: Chromocult | 93 |
| 5.2.5.3 | Placas Petrifilm™ <i>E. coli</i> / Coliformes | 93 |
| 5.2.5.4 | Rida count <i>E. coli</i> / Coliformes | 94 |
| 5.2.5.5 | Coli ID | 94 |
| 5.2.6 | Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> | 95 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5.2.6.1 | Análisis Microbiológico Tradicional | 95 |
| 5.2.6.2 | Placa Petrifilm™ Staph Express | 96 |
| 5.2.6.3 | Rida Count <i>Staphylococcus aureus</i> | 96 |
| 5.2.6.4 | Análisis Microbiológico empleando Agar Baird Parker - bioMérieux | 97 |
| 5.2.7 | Recuento de Hongos y Levaduras | 97 |
| 5.2.7.1 | Análisis Microbiológico Tradicional | 97 |
| 5.2.7.2 | Placa Petrifilm™ Mohos y Levaduras | 98 |
| 5.2.7.3 | Rida Count Mohos y Levaduras | 98 |
| 5.2.8 | Placas Petrifilm™ Recuento de <i>Listeria</i> en Ambientes | 99 |
| 5.2.9 | Informe de los resultados | 100 |
| 5.2.10 | Análisis de mercado | 101 |
| 5.2.10.1 | Análisis de Costos | 101 |
| 5.2.10.2 | Matriz de Planificación: Casa de la Calidad | 102 |
| 6 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 103 |
| 6.1 | Aprobaciones Regulatorias | 103 |
| 6.1.1 | 3M Placas Petrifilm™ | 103 |
| 6.1.2 | Placas Rida Count – Sanita Kun | 109 |
| 6.1.3 | Medio Coli ID (COLI ID-F) | 110 |
| 6.1.4 | Medios de Cultivo (Scharlau) | 111 |
| 6.1.5 | Medio de Cultivo Cromogénico: Chromocult <i>E. coli</i> /Coliformes | 111 |
| 6.1.6 | Medio Baird Parker (bioMérieux) | 112 |
| 6.2 | Análisis de costos | 113 |
| 6.3 | Unidades de Empaque | 117 |
| 6.3.1 | Medios de Cultivo (Scharlau) | 117 |
| 6.3.2 | Medio cromogénico CHROMOCULT (Merck) | 119 |
| 6.3.3 | Placas Petrifilm™ | 120 |
| 6.3.4 | Placas Rida count | 123 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 6.3.5 | Coli ID | 124 |
| 6.4 | Canales de Venta | 125 |
| 6.4.1 | 3M Placas Petrifilm™: | 125 |
| 6.4.2 | Placas RIDA COUNT | 127 |
| 6.4.3 | Medios de Cultivo: Scharlau | 128 |
| 6.4.4 | Medio de cultivo cromogénico: Merck | 129 |
| 6.5 | Matriz de Calidad: Casa de la calidad | 130 |
| 6.6 | Técnico | 137 |
| 6.6.1 | Resultados y discusión. | 137 |
| 6.6.1.1 | Mesófilos aerobios | 138 |
| 6.6.1.2 | Enterobacterias | 141 |
| 6.6.1.3 | Coliformes | 142 |
| 6.6.1.4 | <i>E. coli</i> | 144 |
| 6.6.1.5 | <i>S. aureus</i> | 148 |
| 6.6.1.6 | Hongos y levaduras | 150 |
| 6.7 | Detección de <i>Listeria sp</i> en Superficie | 152 |
| 6.8 | Ventajas y desventajas entre las técnicas de recuento. | 156 |
| 7. | CONCLUSIONES | 165 |
| 8. | RECOMENDACIONES | 169 |
| 9. | REFERENCIAS | 170 |
| 10. | ANEXOS | 180 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| TABLA 1. Composición (g/l) Agar Chromocult de Merck | 56 |
| TABLA 2. Composición (g/l) del medios cromogénico <i>E. coli</i> / Coliformes OXOID | 57 |
| TABLA 3. Composición (g/l) de medios cromogénico Coli ID bioMerieux. | 58 |
| TABLA 4. Rangos (UFC) utilizados para el recuento de colonias. | 99 |
| TABLA 5. Aprobaciones y reconocimientos de las Placas Petrifilm™ | 106 |
| TABLA 6. Aprobaciones RIDA®COUNT | 110 |
| TABLA 7. Aprobaciones coli ID | 111 |
| TABLA 8. Aprobaciones bioMerieux | 112 |
| TABLA 9. Costo total de análisis para el montaje de una muestra (triplicado) | 116 |
| TABLA 10. Unidades por empaque de las Placas Petrifilm™ | 122 |
| TABLA 11. Distribuidores de las Placas Petrifilm™. | 126 |
| TABLA 12. Distribuidores autorizados de la Placa RIDA COUNT | 127 |
| TABLA 13. Distribuidores autorizados de medios de cultivo Scharlau. | 129 |
| TABLA 14. Distribuidores autorizados de medios de cultivo cromogénicos: Merck | 129 |
| TABLA 15. Número de empresas que emplean Técnica tradicional y otras Técnicas de recuento | 133 |

| | | |
|------------------|--|------------|
| TABLA 16. | Técnicas rápidas más utilizadas para el análisis Microbiológico en la industria de alimentos. | 134 |
| TABLA 17. | Análisis microbiológico que se realizan habitualmente en la industria de alimentos. | 135 |
| TABLA 18. | Nivel promedio de Mesófilos aerobios determinado por el método Tradicional, Placas Petrifilm™ y placas Rida count en las muestras en estudio. | 139 |
| TABLA 19. | Nivel promedio de Enterobacterias determinado por el método Tradicional, Placas Petrifilm™ y Rida count en las muestras de estudio | 141 |
| TABLA 20. | Nivel promedio de Coliformes determinado por el método por el método Tradicional Placas Petrifilm™ y Placas Rida count en las muestras en estudio. | 143 |
| TABLA 21. | Nivel promedio de <i>E. coli</i> determinado por el método Tradicional, Placas Rida count y Coli ID en las muestras en estudio | 145 |
| TABLA 22. | Nivel promedio de <i>S.aureus</i> determinado por el método Tradicional, Placas Petrifilm™, Placas Rida Count y bioMerieux en las muestras en estudio. | 150 |
| TABLA 23. | Nivel promedio de Hongos y levaduras determinado por el método Tradicional, Placas Petrifilm™ y Placas Rida count en las muestras en estudio. | 151 |
| TABLA 24. | Interpretación cuantitativa y semi cuantitativa de las Placas Petrifilm™ para monitoreo de <i>Listeria sp</i> en ambientes. | 155 |
| TABLA 25. | Ventajas y desventajas entre las técnicas de recuento estudiadas | 156 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| FIGURA 1. Diseño 3M Placas Petrifilm™. Fuente: 3M | 46 |
| FIGURA 2. Estructura de Rida count. Fuente: Corporación Chisso | 52 |
| FIGURA 3. Tiempo requerido para el montaje de una muestra por triplicado utilizando Técnica tradicional , Placas Petrifilm™, Placas Rida Count y Coli ID. | 115 |
| FIGURA 4. Ahorro de espacio en la incubadora utilizando Placas Petrifilm™, Placas Rida® count y Cajas de petri | 116 |
| FIGURA 5. Costo total para el análisis de una muestra (por Triplicado) | 117 |
| FIGURA 6. Presentación de los medios de cultivo Scharlau y certificado de análisis. Fuente: Autor | 119 |
| FIGURA 7. Presentación del medio cromogénico Chromocult (Merck) Fuente: Autor | 120 |
| FIGURA 8. Presentación del empaque de las Placas Petrifilm™ y carta con información del producto. Fuente: 3M, Autor | 121 |
| FIGURA 9. Información adjunta en cada una de las 3M Placas Petrifilm™ Fuente: Autor | 122 |
| FIGURA 10. Presentación de los empaque de las Placas de Rida Count. Fuente: Autor | 123 |
| FIGURA 11. Información adjunta en cada una de las Placas de Rida Count. Fuente: Autor | 124 |
| FIGURA 12. Presentación del medio cromogénico Coli iD Fuente: bioMerieux | 125 |

| | | |
|-------------------|---|------------|
| FIGURA 13. | Casa de la calidad. Fuente: Autor | 132 |
| FIGURA 14. | Porcentaje de uso de técnicas de recuento en la industrial. Fuente. Autor | 134 |
| FIGURA 15. | Técnicas rápidas empleadas actualmente en el mercado. Fuente: Autor | 135 |
| FIGURA 16. | Análisis microbiológicos realizados comúnmente en las empresas de alimentos. Fuente: Autor | 136 |
| FIGURA 17. | Análisis microbiológico complementario en la industria de alimentos. Fuente :Autor | 137 |
| FIGURA 18. | Coeficientes de correlación de los recuentos para la confirmación de Mesófilos aerobios obtenidos con las Placas Petrifilm™ y placas Rida Count a partir de 9 grupos de alimentos. | 140 |
| FIGURA 19. | Coeficientes de correlación de los recuentos para la confirmación de Enterobacterias obtenidos con las Placas Petrifilm™ y placas Rida Count a partir de 9 grupos de alimentos. | 142 |
| FIGURA 20. | Coeficientes de correlación de los recuentos para la confirmación de Coliformes fecales obtenidos con las Placas Petrifilm™ y placas Rida Count a partir de 9 grupos de alimentos. | 144 |
| FIGURA 21. | Coeficientes de correlación de los recuentos para la confirmación de <i>E.coli</i> obtenidos con las Placas Petrifilm™, Placas Rida Count y Coli ID a partir de 9 grupos de alimentos. | 146 |
| FIGURA 22. | Coeficientes de correlación de los recuentos para la confirmación de <i>S.aureus</i> obtenidos con las Placas Petrifilm™, Placas Rida Count y bioMerieux, a partir de 9 grupo de alimentos. | 149 |

| | |
|--|------------|
| FIGURA 23. Coeficientes de correlación de los recuentos para la confirmación de Hongos y levaduras obtenidos con las Placas Petrifilm™ y placas Rida Count a partir de 9 grupos de alimentos. | 152 |
| FIGURA 24. Placas Petrifilm™ para la detección de <i>Listeria</i> en ambientes. Fuente: Autor | 153 |
| FIGURA 25. Placas Petrifilm™ para la detección de <i>Listeria</i> en superficies, resultados obtenidos a las 28 horas de incubación y con 24 horas adicionales. Fuente: Autor | 154 |

TABLA DE ANEXOS

| | Pág. |
|---|-------------|
| ANEXO 1. Encuesta: Técnicas de recuento para microorganismos indicadores en la industria de alimentos | 180 |
| ANEXO 2. Características microbiológicas que debe cumplir los alimento de consumo humano | 183 |
| ANEXO 3. Fundamento de los productos comerciales | 186 |
| ANEXO 4. Resultados de los recuentos (Log UFC/ ml o g) en cada una del as técnicas de recuento rápido utilizado y la Técnica Tradicional | 188 |
| ANEXO 5. Medios de cultivo | 194 |

RESUMEN

Las empresas procesadoras de alimentos para proporcionar productos de inocuos a sus consumidores, se ven en la necesidad de realizar análisis microbiológicos que le den indicios de la inocuidad del producto y de su idoneidad para ser aptos para el consumo humano. Sin embargo, muchas veces estos análisis resultan ser dispendiosos y demorados, por lo cual actualmente se hace necesario contar con productos que permitan desarrollar estos análisis de manera rápida aumentando la productividad de los laboratorios y más importante aún que proporcionen resultados confiables y seguros.

En este estudio, con el fin de identificar las ventajas, desventajas y oportunidades de mejora que presentan las Placas Petrifilm™ elaboradas por la empresa 3M frente a la competencia actual en el mercado, se llevo a cabo un análisis comparativo entre seis productos para la cuantificación de microorganismos indicadores en muestras de alimentos. Esta comparación se realizó desde el área comercial, técnica y de aprobaciones nacionales e internacionales.

Los productos ensayados fueron: 3M Placas Petrifilm™, Placas Ridacount, Medio de cultivo Chromocult de Merck, Coli ID de Biomeraux, Baird Parker de Biomeraux y la técnica tradicional empleada para la enumeración de microorganismos Mesófilos, Enterobacterias, Coliformes, *E. coli*, *S. aureus* y Mohos y Levaduras. Adicionalmente para evaluar el desempeño de la placa Petrifilm para detección de *Listeria* en ambientes se evaluó la selectividad.

Por otro lado, se evaluaron los productos presentes en el mercado en términos de aprobaciones y regulaciones a nivel nacional e internacional y el impacto que estas tienen en el mercado. La comparación comercial, se basó en el estudio de los precios, canales de venta, unidades de empaque e inversión en el mercado de cada una de las casas comerciales que fabrican estos productos.

Finalmente para identificar las necesidades y preferencias de los clientes al momento de seleccionar su método de recuento, se aplicó una encuesta a las personas encargadas del control de calidad de empresas del sector alimentario reconocidas, las cuales sirvieron de base para la construcción de una matriz de planificación.

Los resultados demostraron la necesidad actual que existe de desarrollar análisis en el menor tiempo posible y aun más importante que no representen un gasto excesivo. Las encuestas realizadas demuestran que la mayoría de las empresas de la industria nacional realizan sus análisis por métodos convencionales y únicamente en situaciones de emergencia emplean los productos de recuento rápido como Placas Petrifilm™ o placas Rida Count. Es por esto que se hace necesaria la divulgación de los beneficios que puede traer consigo el uso de las nuevas alternativas que se presentan en el mercado para el análisis microbilógico.

1. INTRODUCCIÓN

Los mercados cada vez más competitivos, la consolidación creciente de la industria, la demanda de normas de seguridad más estrictas en los procesos de producción y el conocimiento cada vez más amplio de la transmisión de enfermedades a través de alimentos, han determinado que un gran número de industrias del sector alimentario consideren la necesidad de optar por planes que ofrezcan una continua mejora tanto en la fabricación y la elaboración de los alimentos, como en el someter sus productos a ciertas pruebas o estudios encaminados a evaluar su inocuidad y su calidad, lo cual se consigue proporcionando análisis de laboratorio más rápidos, fiables y coherentes, como también mejorando la productividad y rentabilidad de la línea de producción. Consecuentemente con esta necesidad, se han puesto a punto muchas técnicas para el examen microbiológico de los alimentos, estos métodos empleados para controlar la calidad son en sí mismos muy variados y dependientes, en gran parte, del alimento que va a ser analizado.

Las técnicas microbiológicas en el sector de los alimentos, están dirigidas con mayor frecuencia a la detección de microorganismos indicadores de la posible presencia de patógenos o alterantes, los métodos convencionales de detección de microorganismos como la técnica del NMP, filtración por membrana, siembra en profundidad o vertido en placa, requieren en primer lugar que el microorganismo objeto del análisis forme una colonia en un medio de cultivo, lo cual implica su preparación, esterilización de material, mano de obra suficiente,

periodos de incubación relativamente largos, el empleo de cultivos de enriquecimiento o de recuperación y se debe disponer de equipos necesarios como incubadoras, neveras, autoclave, etc.

Puesto que los procedimientos tradicionales son laboriosos y requieren de mucho tiempo, para evitarlo se han desarrollado numerosas técnicas de recuento rápido y efectivo en las cuales se busca utilizar el menor número de procedimientos y ensayos posibles. Entre estas técnicas se incluyen métodos inmunoenzimáticos (ELISA), de impedancia, de separación inmunomagnética, bioluminiscencia del ATP, PCR y técnicas de recuento en placa como Petrifilm, Ridacount, Simplate, medios cromogénicos y fluorogénicos y dipslides.

Como líder reconocido en pruebas microbiológicas, 3M Microbiología ha respondido a las necesidades únicas de la industria de alimentos y bebidas con soluciones innovadoras para los laboratorios, además esta dedicado a ofrecer productos que cumplan con los requerimientos más exigentes entre las organizaciones mundiales de referencia, agencias regulatorias de aprobaciones, y corporaciones multinacionales. Las placas de Petrifilm™ de 3M™ son una familia de placas listas para usarse, que están diseñadas con el fin de ofrecer ahorro de tiempo, incrementar la productividad, garantizar confiabilidad y mejorar la eficiencia en los procesos.

El objetivo de este trabajo de investigación fue por lo tanto, evaluar la competencia en el mercado para 3M Microbiología en técnicas de recuento rápido, mediante un estudio técnico y de aprobaciones que permita establecer las ventajas y desventajas que ofrece las Placas Petrifilm™ en el análisis microbiológico. Este estudio se efectuó a través de pruebas de laboratorio y el análisis de diferentes muestras de alimento, empleando las técnicas de recuento tradicional de microorganismos indicadores, Placas Petrifilm™, Placas Rida® count y medios preparados cromogénicos diseñados para este fin.

1. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

La presencia de microorganismos en los alimentos no representa necesariamente un peligro para el consumidor o una calidad inferior en estos productos, más si se tiene en cuenta que la gran mayoría contiene naturalmente levaduras, mohos, bacterias y otros microorganismos inocuos. La mayor parte de los alimentos se convierten en potencialmente peligrosos solo después de que se han violado los principios de higiene, limpieza y desinfección. La puesta en evidencia de estos riesgos se basa en el examen de muestras de alimentos en busca de los propios agentes causales o indicadores de una contaminación no admisible. (ICMSF, 2000)

De ahí surge la necesidad de que todas las industrias conozcan la calidad microbiológica de sus productos, a nivel de las materias primas que usan, que conozcan la calidad de todos los procesos de elaboración y por supuesto la calidad del producto final.

Los métodos de análisis deben proporcionar las bases necesarias para poder emitir dictámenes sobre la calidad y seguridad microbiológica de los alimentos. Es por ello que antes de seleccionar un método para la detección de microorganismos, se debe conocer la sensibilidad y reproductibilidad.

Los microorganismos indicadores se han utilizado para varios fines, sin embargo, el principal objetivo de emplear bacterias como indicadores de prácticas no sanitarias es revelar los defectos de tratamiento que llevan consigo un peligro

potencial que no esta necesariamente en la muestra particular examinada, pero que es probable encontrarse en muestras paralelas. (ICMSF, 2000)

2.1 Análisis Microbiológico de Alimentos

El análisis microbiológico en la industria de alimentos se constituye en una herramienta básica para el control de materias primas, procesos y productos y manipuladores, ya que permite establecer el valor grado de contaminación biológica de estos, por esta razón el control microbiológico es parte fundamental en todo el proceso (Carrascal, et al., 2003)

Los principales objetivos del análisis microbiológico son:

1. Asegurar que el alimento cumpla con las normas estatuarías
2. Que se ajuste a normas internas establecidas por la empresa que los procesa y a las que exija el comprador
3. Que las materias alimenticias que llegan a la planta para ser procesadas cumplan las normas exigidas y pactadas con el productor
4. Que se mantenga el control del proceso y la higiene de la línea de fabricación. (Hayes, 1993)

Los métodos de examen microbiológico utilizados para controlar la calidad del alimento son en si mismos muy variados y dependientes, en gran parte del alimento que va a ser analizado.

Para el análisis microbiológico se debe tomar un peso conocido del alimento (10 ó 25 g). El alimento se debe adicionar en un diluyente como agua peptonada al 0.1%. El tratamiento implica una homogenización mecánica o en Stomacher. El volumen del diluyente utilizado generalmente es nueve veces mayor que la muestra; para 25 g se utilizan 225 ml de diluyente de forma que se obtenga un homogenizado de dilución 10^{-1} , a partir de la cual se preparan las

correspondientes diluciones seriadas en base 10, dependiendo de la calidad microbiológica del producto objeto de análisis. (Hayes, 1993)

2.2 Recuento y Siembra en Profundidad y Superficie

Cada tipo de recuento de microorganismos viables es potencialmente útil para fines específicos. Los recuentos de bacterias viables se basan en el número de colonias que se desarrollan en placas de agar que han sido previamente inoculadas con cantidades conocidas de alimento diluido e incubadas en condiciones ambientales predeterminadas. Tales recuentos se denominan, en algunos casos con evidente error, recuentos totales en placa, cuando en realidad únicamente pueden contarse aquellas bacterias que pueden crecer en condiciones ambientales elegidas; pues se pueden cambiar las condiciones ambientales, las de incubación, la composición del medio (añadiendo inhibidores selectivos al medio o agentes con actividad de superficie o colorantes) favoreciendo así el crecimiento de uno u otro microorganismo. (ICMSF, 2000)

2.2.1 Recuento y Siembra en Profundidad

Esta técnica se caracteriza fundamentalmente por la recuperación de células bacterianas viables. Una célula viable se define como la que es capaz de dividirse para dar lugar a descendencia y la forma habitual para llevar a cabo un recuento de este tipo, es determinado por el número de células capaces de generar colonias sobre la superficie de un medio sólido. El subracional que subyace en este tipo de prueba es que cada célula viable puede dar lugar a una colonia. (Anderson y Calderón, 1999)

En esta técnica un volumen no mayor de 1 ml de la dilución apropiada se mezcla con el medio de cultivo fundido. La placa se incuba hasta la aparición de colonias contables (ICMSF, 2000)

2.2.2 Recuento y Siembra en Superficie

Este tipo de recuento se define como un procedimiento en el cual cada célula viable puede formar una colonia en placa con agar específico para el microorganismos, donde un cierto volumen de cultivo diluido que no suele ser superior a 0.1 ml se extiende sobre la superficie de una placas con medio sólido utilizando una asa estéril o escobillón de vidrio. La placa se incuba en un ambiente predeterminado, hasta que aparecen las colonias y se cuenta su número. (NTC 4092)

2.3 Microorganismos Indicadores en la Industria de Alimentos

El análisis rutinario de los alimentos para poner de manifiesto un amplio rango de bacterias patógenas resultaría poco práctico para la mayoría de las industrias. Es por esto que se ha convertido en práctica corriente investigar en los alimentos la presencia de grupos indicadores que determinen la posibilidad de la existencia de microorganismos causantes de intoxicaciones o de otros riesgos asociados al crecimiento microbiano (Hayes, 1993)

Por ello se le denominan microorganismos indicadores y se catalogan frecuentemente como de gran importancia al establecer la seguridad y calidad microbiológica de los alimentos. (Hayes, 1993)

Un microorganismo dado puede actuar como índice, como indicador o los dos simultáneamente, incluso en un mismo alimento. A pesar de que actualmente es posible detectar casi cualquier tipo de microorganismo patógeno, se siguen llevando a cabo análisis de microorganismos determinados como marcadores por razones de economía, rapidez y sensibilidad. Los principales microorganismos empleados como indicadores son: bacterias Mesófilas aerobias, Coliformes, Enterococos, Enterobacteriaceae y los hongos y levaduras. (Hayes, 1993)

2.3.1 MESÓFILOS AEROBIOS

Los microorganismos mesófilos aerobios son el grupo más grande de indicadores de calidad de los alimentos. Se definen como un grupo heterogéneo de bacterias capaces de crecer en un rango de temperatura entre 15 – 45°C, con un óptimo de 35°C, siendo la mínima de 15 a 20 °C y la máxima de 45°C. Casi todos los agentes patógenos humanos son mesófilos, como es de esperar, pues la temperatura corporal humana es, casi de forma constante, de 37°C. (Prescott *et al.*, 1999)

En productos terminados son empleados como indicadores de vida útil. El número de microorganismos aerobios mesófilos encontrados en un alimento ha sido uno de los indicadores microbiológicos de calidad más comúnmente utilizado. El recuento de la flora aerobia mesófila tiene un valor limitado a la hora de juzgar la seguridad de los alimentos. Esta determinación permite obtener información sobre la alteración incipiente de los alimentos, su probable vida útil, la descongelación incontrolada de los alimentos o los fallos en el mantenimiento de las temperaturas de refrigeración. Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. Ahora bien, salvo en alimentos obtenidos por fermentación, no son recomendables recuentos elevados. (ICMSF, 2000; Prescott *et al* 1999, www.analizacalidad.com)

Para el recuento de mesófilos aerobios se emplean medios de cultivo sin inhibidores para permitir el crecimiento de los microorganismos. No aplica para productos enlatados como tampoco para productos fermentados, ya que por la naturaleza de ese tipo de alimentos, el recuento no sería representativo. (ICMSF, 2000)

El recuento de mesofilos aerobios permite:

- Verificar efectividad de los procedimientos de limpieza y desinfección.

- Determinar si las temperaturas aplicadas en los procesos fueron las adecuadas.
- Determinar el origen de la contaminación durante los procesos de elaboración de alimentos.
- Verificar condiciones óptimas de almacenamiento y transporte.
- Obtener información acerca de la vida útil de los alimentos.
- Indicar alteración incipiente en ciertos alimentos.

Los métodos utilizados habitualmente para el recuento de la flora aerobia mesófila son:

- Método de recuento en placa, también denominado método en placa de microorganismos aerobios o método de recuento en placa por siembra en todo el medio (revisado por Hartman y Huntsberger, 1961; Angelotti, 1964)
- Método de recuento en placa de siembra por extensión en superficie (Reed y Reed, 1948; J.J.R. Campell y Konowalchuck, 1948; Gaudy y col., 1963; D.S. Clark, 1967).
- Método de recuento en placa por siembra de gotas en superficie (Miles y Misra, 1938; Sharpe y Kilsby, 1971)

2.3.2 ENTEROBACTERIACEAE

La familia *Enterobacteriaceae* incluye bacilos gram negativos anaerobios facultativos, inmóviles o móviles con flagelos peritricos, con necesidades nutricionales sencillas. Las propiedades metabólicas de *Enterobacteriaceae* son muy útiles para caracterizar sus géneros constituyentes. Los miembros de esta familia, a menudo denominados enterobacterias o bacterias entéricas, degradan azúcares mediante la ruta de Embden-Meyerhof y escinden el ácido pirúvico para producir ácido fórmico en fermentaciones del ácido fórmico. Las bacterias

entéricas producen grandes cantidades de gas durante la fermentación del azúcar, como las especies de *Escherichia*, tiene el complejo hidrogenilasa fórmica que degrada el ácido fórmico a H₂ y CO₂. Esta familia puede dividirse en dos grupos, en función de sus productos de fermentación. La mayoría llevan a cabo una fermentación ácido-mixta y producen principalmente Lactato, Acetato, Succinato, Formionato y Etanol. De la fermentación butanodiolica, los productos principales son butano, etanol y CO₂. Debido a que las bacterias entéricas son de aspecto tan similar, normalmente se utilizan pruebas bioquímicas para identificarlas tras un examen preliminar de su morfología, movilidad y crecimiento. (Prescott *et al.*, 1999)

Las pruebas usadas para medir características metabólicas de Enterobacterias son: utilización de hidratos de carbono, actividad de o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG), producción de indol, rojo de metilo, pruebas de Voges-Proskauer, utilización de citrato, producción de ureasa, descarboxilación de la lisina, arginina y ornitina, producción de fenil-alanina desaminasa, producción de H₂S y movilidad. (Prescott *et al* 1999; Koneman, 1999)

La presencia considerable de *Enterobacteriaceae* en alimentos indica un tratamiento inadecuado y/o contaminación posterior al tratamiento; mas frecuentemente a partir de materias primas, equipos sucios o manejo no higiénico. Igualmente, su presencia de *Enterobacteriaceae* indica multiplicación microbiana que hubiera el crecimiento de toda la serie de microorganismos patógenos y toxigénicos. (ICMSF, 2000)

Los métodos para la detección de *Enterobacteriaceae* implican el enriquecimiento de las muestras de alimento en agua peptona tamponada o en caldo tripticosa soya y la detección de los microorganismos oxidasa positiva a partir de su crecimiento subsiguiente en agar bilis lactosa glucosa rojo neutro cristal violeta. Este procedimiento estimula el desarrollo de los miembros de la familia

Enterobacteriaceae presente en alimentos. Entre los procesos existentes para la detección de *Enterobacteriaceae* se encuentra: prueba de ausencia presencia, recuento por siembra en placa y pruebas confirmatorias. (ICMSF, 2000)

2.3.3 COLIFORMES

Este grupo de microorganismos comprende varios géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, capaces de fermentar la lactosa, están ampliamente difundidos en la naturaleza, agua y suelo. También son habitantes normales del tracto intestinal del hombre y animales de sangre caliente. Las bacterias coliformes son capaces de fermentar la lactosa a 35°C con producción de gas. Dentro de los coliformes totales se pueden distinguir dos tipos, por un lado están los coliformes fecales (CF), que provienen del tracto intestinal de animales de sangre caliente y que serian los mejores indicadores de riesgo de afecciones humanas, y por otro lado existe otro grupo de coliformes que son residentes naturales en el suelo y agua. (Madigan *et al.*,2004; Perdomo *et al*, 2001)

Las principales bacterias coliformes son ***Escherichia coli*** y ***Enterobacter aerogenes***. La primera se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal del hombre y de los animales y raramente aparece en otro lugar, mientras que *Enterobacter aerogenes* se asocia normalmente con la vegetación y solo ocasionalmente aparece en el intestino.

Su presencia en alimentos representa mala calidad higiénica en el proceso, falta de higiene de los manipuladores o recontaminación después de proceso. Estas, si bien no son generalmente patógenas de por sí, son indicadores de presencia de microorganismos potencial mente patógenos y por lo tanto son un índice de deficiencias sanitarias. (Perdomo *et al*, 2001)

Los métodos convencionales para la determinación de coliformes se basan en la técnica del NMP, este método fue dado a conocer por McCrady en 1915, no es un método de análisis exacto y al igual que en la técnica de recuento en placa

requiere la preparación de diluciones de las muestras de alimentos, de las cuales se toman alícuotas para sembrar en tubos con medio apropiado. El número de microorganismos en la muestra original se determina usando las tablas normales del NMP. El método es de por si estadístico, y los resultados generalmente son mas elevados que los resultados del recuento en placa. (Jay, 2002)

Los procedimientos para la detección de coliformes difieren en los medios de cultivo empleados, en un método se emplea caldo lauril sulfato triptosa, seguido de la confirmación de los tubos positivos de gas en caldo lactosa bilis (2%) verde brillante y la incubación se hace entre 35 y 37 °C. Otro método emplea solamente el caldo de Mac Conkey finalmente el ultimo procedimiento emplea caldo lactosa bilis (2%) verde brillante con una posterior confirmación en placas de agar bilis lactosa rojo neutro cristal violeta o de agar Endo. (ICMSF, 2000)

Para la determinación de coliformes fecales existen dos métodos: el primero emplea caldo E.C con incubación a 45.5 ± 0.2 °C y las siembras se hacen a partir de tubos de caldo lauril sulfato triptosa gas positivo. El segundo, ampliamente extendido en Europa, utiliza caldo lactosa bilis (2%) verde brillante con incubación a 44 ± 0.1 °C, haciéndose la siembra a partir de tubos de caldo Mac Conkey gas positivos. (ICMSF, 2000)

2.3.4 *Escherichia coli*

La especie *Escherichia coli* comprende bacilos gram negativos, no esporulados y con flagelos peritricos en el caso de ser móviles. Los cultivos son anaerobios facultativos, citocromo oxidasa negativos y sensibles al cianuro potásico, reducen los nitratos a nitritos y poseedores de una proporción G+C de 39 a 59% en su DNA. El crecimiento a partir de pequeños inóculos se inicia a un intervalos de pH entre 4,4 y 8,8, a un rango biocinético de 9-44 °C y en gradientes salinos de 0-0.65%. Fermenta gran variedad de azúcares, tales como arabinosa, el manitol, la

glucosa y la xilosa, produciendo una mezcla de ácidos, etanol, CO₂ e hidrógeno. (ICMSF, 2000; <http://www.bvsops.org.uy/pdf/coli.pdf> Bvs Uruguay, 2008)

Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. Las investigaciones ecológicas han demostrado que *E. coli* proviene del tracto intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, si bien puede sobrevivir e incluso multiplicarse en otros nichos apropiados. Por lo tanto, la presencia de esta bacteria indica que puede haber existido contaminación fecal y que el consumidor podría estar expuesto a patógenos entéricos cuando ingiere el alimento. (Mossel, 2003; Bvs Uruguay, 2008)

Para la evaluación higiénica de los alimentos crudos o de productos que no han sido sometidos al tratamiento de inocuidad completo mediante calor, *E.coli* es el microorganismo índice más válido. Para la detección de *Escherichia coli* comúnmente se utilizan las pruebas para coliformes y una de confirmación a través de las pruebas IMViC (indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato sódico). (ICMSF, 2000)

En el análisis de agua *E. coli* es el indicador clásico de la posible presencia de patógenos entéricos. Hay una relación directa entre el número de *E. coli* e intensidad de contaminación fecal, cuando mayor es el número, mayor es la contaminación. En los alimentos la presencia y concentración de *E. coli*, incluso en mayor número, no implica necesariamente una contaminación fecal intensa reciente. Su número está influenciado por muchos factores como crecimiento actual en el alimento, deficiencia en la limpieza del equipo o contaminación a partir de las personas manipuladoras del alimento. Por lo tanto lo que puede concluirse es que la contaminación fecal directa o indirecta, tuvo lugar en alguna fase de su obtención y que la seguridad sanitaria del alimento es cuestionable. (Hayes, 1993)

Las cepas de *E. coli* que provocan la enfermedad diarreica se clasifican en grupos específicos basados en propiedades de virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos y serogrupos O:H diferentes. Estas clases incluyen: cepas de *E. coli* enteropatógenas (EPEC), cepas de *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), cepas de *E. coli* enteroinvasoras (EIEC), cepas de *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), cepas de *E. coli* enteroagregantes (EAaggEC) y cepas de *E. coli* enterohemorrágicas. (Doyle, 1997)

2.3.5 HONGOS Y LEVADURAS

Los hongos y levaduras son microorganismos eucariotas, pueden ser unicelulares o pluricelulares. Las levaduras son hongos con forma oval (5-20 µm) inmóviles y que se dividen por diversos mecanismos, especialmente por gemación. Deben considerarse como hongos que han perdido su forma filamentosa y se han convertido en organismos unicelulares. (Tortora, 1993)

La mayoría de los hongos, sin embargo, son pluricelulares o filamentosos y se caracterizan por estar constituidos por filamentos ramificados o hifas que se desarrollan y entrelazan formando micelio. Existe un micelio vegetativo adosado a la superficie del sustrato (suelo, plantas, alimentos) y un micelio aéreo o reproductor, donde se forman las esporas (sexuales y asexuales). (Alexopoulos, 1966)

Los hongos filamentosos y levaduras son en su mayoría saprófitos, hallándose libres en la naturaleza, especialmente en la materia orgánica en descomposición. Algunas especies son parásitas, formando parte de la flora normal, como por ejemplo *Candida albicans*, que es una levadura y puede comportarse como oportunista y resultar patógena cuando se produce una disminución en los mecanismos de resistencia del individuo. Otras especies de hongos pueden

producir durante su desarrollo sustancias tóxicas o micotoxinas como, por ejemplo, las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*, que es un hongo filamentoso. Por otra parte, algunos hongos son difásicos, es decir, unas veces se comportan como hongos filamentosos y otras como levaduras. (Anderson Y Calderón, 1999)

Las levaduras y los mohos crecen más lentamente que las bacterias en los alimentos no ácidos que conservan humedad y por ello pocas veces determinan problemas en tales alimentos. Sin embargo, en los alimentos ácidos y en los de baja actividad de agua, crecen con mayor rapidez que las bacterias, determinando por ello importantes pérdidas por alteración de frutas, jugos, vegetales, quesos, productos derivados de los cereales y encurtidos, así como los alimentos congelados y en los deshidratados, cuyo almacenamiento se realiza en condiciones inadecuadas. Además existe el peligro potencial de producción de micotoxinas por parte de los hongos. Por lo tanto, los mohos y las levaduras son los agentes alterantes de un número importante de alimentos. (ICMSF, 2000)

Las condiciones necesarias para que un hongo crezca en superficie son: existencia de esporas, base nutritiva, humedad y temperatura entre 4° y 38° C. En la práctica, los hongos filamentosos y las levaduras también se diferencian en el laboratorio en dos grupos según el aspecto macroscópico de sus colonias: las levaduras forman colonias húmedas, cremosas, opacas o pastosas, y los hongos filamentosos producen colonias algodonosas, lanosas o pulverulentas.

Los hongos a través de sus esporas, micotoxinas presentes en alimentos y por la emisión de compuestos volátiles orgánicos, pueden producir diferentes tipos de enfermedades o alteraciones de la salud:

- Enfermedad infecciosa patogénica: aspergilosis
- Reacciones alérgicas, como rinitis y asma

- Neumonitis por hipersensibilidad
- Cáncer debido a micotoxinas carcinogénicas
- Desordenes inmunológicos por micotoxinas inmunosupresivas
- Reacciones tóxicas por micotoxinas
- Reacciones de inflamación debidas al β -1,3-glucano, compuesto de la pared celular de los hongos
- Irritación debida a compuestos volátiles orgánicos fúngicos como por ejemplo alcohol
- Síndrome del edificio enfermo, entre otros. (Romejo, 2005)

La identificación de los hongos filamentosos se basa en el examen macroscópico de la colonia y en sus características microscópicas. Semejanzas macroscópicas como la forma de la colonia, el color de la superficie, la textura y la producción de pigmentos son muy útiles para la identificación. En general la morfología microscópica de los hongos es estable y presenta pocas variaciones. La identificación definitiva se basa en la norma característica, método de producción y ordenamiento de las esporas, siendo también importante el tamaño y la disposición de las hifas. (Adams & Moss, 1997)

Waksman (1922) sugirió el uso de medios acidificados para el recuento de mohos del suelo y a partir de la fecha se adoptó esta técnica para el recuento de hongos y levaduras en alimentos. Para inhibir el crecimiento de bacterias en estos medios se han utilizado antibióticos como cloranfenicol, estreptomina, ciclotetraciclina, oxitetraciclina y gentamicina. La mejor incubación de los cultivos se sitúa alrededor de 22°C y el tiempo de incubación más adecuado es de cinco días. Alguno de los medios de cultivo empleados para el aislamiento de hongos y levaduras son el agar Rosa de bengala y el agar oxitetraciclina gentamicina extracto de levadura glucosa (OGY). (Mossel, 2003)

La identificación de los hongos filamentosos se basa en el examen macroscópico de la colonia y sus características microscópicas. Semejanzas microscópicas como la forma de la colonia, el color de la superficie, la textura y la producción de pigmentos son útiles para la identificación. (Adams & Moss, 1997)

En general, la morfología microscópica de los hongos es estable y presenta pocas variaciones. La identificación definitiva se basa en la forma característica, método de producción y ordenamiento de las esporas, siendo también importante conocer el tamaño y la disposición de las hifas. (Adams & Moss, 1997)

2.3.6 *Staphylococcus aureus*

Coco Gram positivo que crece en racimos perteneciente a la familia *Micrococcaceae*, aerobio y anaerobio facultativo y catalasa positivo. Su temperatura óptima de crecimiento es 37° C pero logrando desarrollarse hasta los 10° C o ligeramente menos. Algunas cepas de *S. aureus* producen un exopolisacárido que puede evitar la fagocitosis del microorganismo por parte de los leucocitos polimorfonucleares. Además produce varios tipos de hemolisinas las cuales le ayudan a combatir el sistema inmunológico del hospedador. (Koneman, 1999; Madigan *et al*, 2004; Jay, 2002; Hayes, 1993)

La intoxicación alimentaria estafilocócica es un síndrome caracterizado por náuseas, vómitos, diarrea, malestar y debilidad general. Los síntomas comienzan a manifestarse de 1 a 6 horas después de consumido el alimento. (ICMSF, 2000)

S. aureus ha sido ampliamente caracterizado, ya que se sabe que este microorganismo produce una gran variedad de productos extracelulares. Muchos de ellos, como las enterotoxinas estafilococales, son factores virulentos que han estado implicados en enfermedades de humanos y animales. Estas enterotoxinas elaboran un juego de propiedades biológicas que causan al menos 2

enfermedades humanas comunes, síndrome de shock tóxico e intoxicaciones debidas a *Staphylococcus* en alimentos. (Doyle, 1997). Si en un alimento asociado a un brote es identificado *S. aureus* también se debe estudiar la producción de enterotoxinas, lo cual incrementa la complejidad del ensayo, ya que es usual que *S. aureus* produzca una o más toxinas simultáneamente. Comúnmente las enterotoxinas estafilococales han sido divididas en 5 grandes clases serológicas (A, B, C, D, E) debido a sus propiedades antigénicas, pero en los últimos años se han identificado 9 clases mas (G hasta O). Siendo la A la enterotoxina mas comúnmente recuperada de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. (Vanegas *et al*, 2006)

Las intoxicaciones debidas a *Staphylococcus* en alimentos están clasificadas como las causas más prevalentes de gastroenteritis en el mundo. Esto se debe a la ingestión de una o mas enterotoxinas estafilocócicas preformadas en alimentos contaminados por miembros del género *Staphylococcus*, en donde predomina *Staphylococcus aureus*. (Doyle, 1997)

La principal fuente de contaminación de los alimentos por *Staphylococcus* se debe a la manipulación de estos por parte de personas contaminadas, ya que los humanos son el principal reservorio de este microorganismo. Si bien muchas especies del género *Staphylococcus* se consideran habitantes normales del cuerpo humano, *Staphylococcus aureus* es el patógeno más destacado. En los humanos, las fosas nasales son los sitios de colonización predominantes, aunque se pueden encontrar células de *Staphylococcus aureus* en diferentes sitios de la piel. La diseminación de *Staphylococcus aureus* entre humanos y de los humanos a los alimentos puede ocurrir por contacto directo o indirecto por fragmentos de piel. (Doyle, 1997)

Algunas propiedades únicas de resistencia de *Staphylococcus aureus* facilitan la contaminación y crecimiento en alimentos. Afuera del cuerpo humano

Staphylococcus aureus es uno de los patógenos humanos no esporo formador mas resistente, pues puede sobrevivir por extensos periodos de tiempo. Es por esto que para algunos alimentos procesados o tratados, *Staphylococcus aureus* es un buen indicador del grado de contacto humano, o con alimentos naturales no tratados de origen natural dentro de la fabrica de alimentos (ICMSF, 2000). Por tal razón se debe realizar la búsqueda de *Staphylococcus aureus*; pues su presencia indica insuficiencia en los tratamientos con calor como pasteurización de la leche o cocción de la carne y en el uso de agentes químicos sanitizantes que generalmente destruyen a este microorganismo.

La presencia de *S. aureus* en un alimento se interpreta por lo general, como un indicador de contaminación a partir de la piel, la boca y las fosas nasales de los manipuladores de alimentos, si bien el material y equipos sucios y las materias primas de origen animal pueden ser asimismo la fuente de contaminación.

Para el recuento de *S.aureus* se ha propuesto diversos medios específicos, los cuales difieren principalmente en los agentes selectivos que contienen, entre los que se destacan el telurito de potasio, cloruro de litio, azida sódica, la glicina y la polimixina B. En la actualidad gozan de gran aceptación los medios que contienen yema de huevo junto a uno o más de los agentes selectivos antes mencionados.

Entre los métodos para la detección de *S. aureus* se encuentra la siembra directa en placas de agar Baird Parker, la siembra directa en placas de agar yema de huevo polimixina telurito, la siembra directa en placas de agar KRANEP y la técnica del NMP en telurito manitol glicina.(ICMSF, 2000)

2.3.7 *Listeria sp*

Listeria spp es un microorganismo que está distribuido ampliamente en la naturaleza y tiene características que le permiten sobrevivir y crecer en un rango amplio de condiciones ambientales (Doyle et al., 2001).

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos cortos Gram-positivos (0.5 μ de diámetro y 1-2 μ de longitud), regulares, no esporulados ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas o agrupadas en forma de V o Y. En cultivos viejos pueden aparecer formando filamentos de 6-20 mm de longitud. Presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 28°C pero no a 37°C, debido a que la producción de flagelina se reduce a esta temperatura.

Listeria spp. Forma colonias brillantes, pequeñas (de 1 a 2 mm tras uno o dos días de incubación) y lisas. Al observarse a la lupa con epiiluminación, con un ángulo de la luz de 45°-60°, se observan reflejos de color azul-verdoso sobre una superficie finamente granular. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 30°C y 37°C, pero pueden crecer a 4°C en pocos días. Es anaerobia facultativa, catalasa positiva y oxidasa negativa. Las reacciones de Voges-Proskauer y rojo de metilo son positivas.

Hidrolizan la esculina en pocas horas, pero no la urea ni la gelatina; no producen indol ni SH₂. Producen ácido de la D-glucosa y de otros azúcares. El contenido de guanina-citosina de su ADN es bajo, entre el 36% y el 38%. (Oteo et al, 2006) Anteriormente, el género *Listeria* estaba incluido dentro de la familia *Corynebacteriaceae*, pero en la actualidad se sabe que tienen un parentesco más cercano con los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Por los datos de la secuencia del RNAr de 16S, *Listeria* se sitúa muy próximo a *Brochothrix* (Jay, M. 2002). Actualmente el Manual de Bergey incorpora el género *Listeria* en

el grupo de bacilos no esporulados Gram positivos. *Listeria* pertenece a la Familia: *Listeriaceae*, Orden: *Bacillales*, Clase: *Bacilli*, Fila: *Firmicutes*. (Holt et al., 2000)

El género *Listeria* comprende las siguientes especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. grayi* y *L. denitrificans*. Solamente las dos primeras especies mencionadas se asocian a enfermedades humanas. (Koneman, 1999)

Las necesidades nutritivas de *Listeria* son las típicas de otras muchas bacterias Gram positivas. Crecen bien en muchos medios de cultivo corrientes como los caldos de infusión cerebro corazón (BHI), y en caldo tripticasa soya. Son necesarias por lo menos cuatro vitaminas del grupo B (Biotina, riboflavina, tiamina y ácido teicoico) que sirven como factor de crecimiento, además son necesarios los aminoácidos cisteína, glutamina, isoleucina, leucina y valina. La glucosa mejora el crecimiento de de todas las especies y se produce ácido láctico. Si bien todas las especies utilizan la glucosa por la vía de Embden-Meyerhof, algunas especies utilizan otros varios carbohidratos tanto sencillos como complejos. La especies de *Listeria* se parecen a la mayoría de los Enterococos por ser capaces de hidrolizar la esculina, y crecen en la presencia del 10% o del 40% (p/v) de bilis, en aproximadamente el 10% de NaCl, en el 0.025% de acetato de talio y en el 0.04% del telurito potásico, pero a diferencia de los Enterococos no crecen en la presencia del 0.02% de azida sódica. A diferencia de la mayoría de otras bacterias Gram positivas, crecen en el agar Mc Conkey. Si bien el hierro es importante en su crecimiento *in vivo*, *L. monocytogenes* no posee, aparentemente, compuestos específicos fijadores de hierro, y consigue sus necesidades por movilización reductora del hierro libre que se une a receptores de superficie.

Todas las cepas de *Listeria* crecen a pH neutro y ligeramente alcalino y tiene una escala amplia de pH para el crecimiento, se desarrolla en un pH entre 4.3 y 9.6, puede sobrevivir a pH de 3 y por esta habilidad se ha supuesto que *Listeria* crecería en productos ácidos fermentados. (ICMSF, 1996; Núñez de González *et al.*, 2004). En general algunas especies/cepas crecerán mejor en el intervalo de pH desde 4.1 hasta alrededor de 9.6 (Jay, 2002) y en la escala de temperatura *Listeria* sobrevive y se multiplica a temperaturas desde -2 a 42°C (Moltz & Martin, 2005; Ribeiro *et al.*, 2005), es psicrotrofo, aunque entre 4°C y 5°C el crecimiento es mas lento; crece y sobrevive a temperaturas de refrigeración. Este organismo resiste durante varias semanas a -18°C en varios sustratos. En condiciones ácidas y en los medios de laboratorio, la supervivencia es más corta. (ICMSF, 1996). El crecimiento de *Listeria* en alimentos refrigerados depende de la adquisición de fuentes de nitrógeno (Borezee *et al.*, 2000).

La listeriosis es una enfermedad de origen alimentario atípica de interés principal para la salud pública a causa de la gravedad y el carácter no entérico de la enfermedad (meningitis, septicemia, aborto), la proporción elevada de casos de muerte (en torno al 20-30% de los casos), un tiempo de incubación frecuentemente largo, y una predilección por individuos que tienen enfermedades subyacentes que conducen al deterioro de la inmunidad mediada por células T (Doyle, 1997). La listeriosis también es una enfermedad infecciosa muy seria en el feto y en el recién nacido, provocando una meningitis grave con un elevado porcentaje de mortalidad (Mossel, 2003).

Entre los productos alimenticios más importantes, causantes de la presentación de esta enfermedad en seres humanos, se encuentra la leche y subproductos lácteos, los cuales pueden contaminarse por todo tipo de suciedad medio ambiental portadora del microorganismo y más en vacas con mastitis, las cuales pueden excretar hasta 10^3 UFC/ml (Gallego *et al.*, 2003).

Por sus características psicotróficas, es posible encontrarla en muestras ambientales de fábricas de alimentos particularmente en depósitos de aguas a temperaturas relativamente bajas, incluyendo sistemas de enfriamiento, canales de drenaje y el agua acumulada en bandejas de refrigeración. (Pascual & Calderón, 1999)

Las superficies de los utensilios y los equipos en contacto con el producto en las fases finales del proceso del desposte de las reses, tienen una gran importancia como fuentes de contaminación por *Listeria* durante todo el proceso de transformación de productos. (Franco *et al* ,1995; Fenlon *et al*, 1996; Chasseignaux *et al*, 2001; Lunden *et al*, 2002)

Las principales fuentes de contaminación de *Listeria spp* dentro de las plantas procesadoras de alimentos son:

- ☞ Empleados (A través de su ropa, batas; por el contacto directo del producto con la piel o por el polvo de los zapatos)
- ☞ Animales que excretan la bacteria o presentan contaminación cutánea por medio de vegetales crudos
- ☞ Limpieza y desinfección inadecuadas del equipo
- ☞ En el medio ambiente (a través de bacterias que flotan en la humedad generada en las áreas de trabajo, y que pueden ser transportadas por el aire y el rocío)
- ☞ Falla en la cadena de frío de los productos.
- ☞ Contaminación cruzada del alimento durante el procesamiento y empaque (Hundson & Mead, 1989; Schofield, 1992; Nesbakken *et al*, 1996; Unnerstad *et al*, 1996; Johansson, 1998; Johansson *et al* 1999).

Los métodos para la detección e identificación de *Listeria spp*. Fueron desarrollados por primera vez para su uso en laboratorios clínicos desde mediados de los años 80, cuando *Listeria monocytogenes* fue reconocido como patógeno

importante para el hombre, vehiculizado a través de los alimentos, en todo el mundo se han desarrollado un gran cantidad de métodos para determinar la manera más efectiva de aislar el microorganismo a partir de muestras clínicas y de alimentos y su consiguiente identificación. (Mc Bride & Girard, 1960)

Las industrias de alimentos utilizan normalmente métodos convencionales para la detección e identificación de *Listeria*. Las pruebas de ausencia/presencia en 25 g son los más comúnmente utilizados, pero también se utilizan recuentos por gramo, cuando es necesaria una investigación sobre un riesgo concreto para la salud pública. Con muestras del entorno normalmente se aplican las pruebas de ausencia/presencia mediante el hisopaje en superficies. (Frazier & Westhoff, 1993).

Los medios de selección de utilizados para *Listeria spp.* están constituidos por caldos de enriquecimiento para *Listeria* de la FDA, caldo LBE sin taponar o taponado BLBE, caldo de enriquecimiento primario y secundario, caldo Fraser, seguido por el aislamiento en agares selectivos como: agar Oxford, agar PALCAM. (Bell & Kyriakides, 2000)

Los métodos de muestreo de superficies para la detección de *Listeria* comprende los métodos de escisión y arrastre por escobillón, los cuales son de amplia aceptación porque son fáciles de usar y requieren solo de pequeñas cantidades de material especializado y porque los datos son generalmente mas reproducibles. La escisión es considerado el método más exacto, y el escobillón uno de lo más prácticos. (Reid et. al., 2002)

El aislamiento de *Listeria spp* empleando métodos tradicionales, se lleva a cabo mediante un pre-enriquecimiento no selectivo, el cual se lleva a cabo tomando 25g de muestra y se le adicionan 225ml de caldo tripticasa soya con adición de

1.4ml de piruvato sódico al 10%, esta suspensión se mezcla durante 2 minutos y se incuba durante 24h a 36°C +/- 1°C.

El enriquecimiento selectivo primario consiste en transferir 1ml de la suspensión del caldo tripticasa de soya a 10ml del caldo de enriquecimiento *Listeria* el cual se incuba a 35°C durante 48h. De este caldo *Listeria* se toma 1ml para adicionarlo a 10ml del caldo Fraser complementado con 0.1ml del complemento Fraser y se incuba a 35°C durante 48 horas. A este proceso se le llama Enriquecimiento selectivo secundario. Los tubos que no presenten ennegrecimiento se descartan debido a que son negativos para *Listeria*, y presuntivos los que si presentan este color. De estos tubos se toma una asada y se siembra por el método de estrías en agar Palcam y agar Oxford y se incuban a 35°C durante 48h. Para la identificación de *Listeria sp* se realizan pruebas bioquímicas de catalasa, reducción de nitritos, fermentación de manitol, ramnosa y xilosa, movilidad y prueba de hemolisis mediante la prueba de CAMP (Sánchez *et al*, 2006).

2.4 Métodos Rápidos para la Enumeración de Microorganismos

Indicadores.

Ya que realizar un análisis microbiológico suele ser una tarea que consume gran cantidad de tiempo y trabajo, se ha presentado la necesidad de desarrollar métodos rápidos y fáciles para cuantificar y detectar microorganismos, ya que en algunas ocasiones es necesario dar resultados rápidos, que permitan tomar decisiones lo más pronto posible , esto muchas veces no es posible, debido a que se debe esperar que los microorganismos crezcan en los medios de cultivo y lograr visualizar su presencia, siendo además muchos de ellos de crecimiento lento, los microorganismos de interés están presentes a menudo en cantidades muy pequeñas con respecto al resto de la microbiota acompañante, lo que implica un pre enriquecimiento previo en medios selectivos, finalmente, dependiendo del producto a analizar, es necesario realizar un previo tratamiento o purificación de los microorganismos, para evitar las interferencias de la matriz en la que estos se encuentran.

Los métodos rápidos ofrecen la posibilidad de evitar algunos de estos pasos, con el ahorro de tiempo y trabajo. Pero no siempre se dispone de estos métodos y a veces demandan altos costos. Estos métodos son un conjunto de técnicas microbiológicas, bioquímicas, fisiológicas, inmunológicas y serológicas para el aislamiento más efectivo, la detección, caracterización y enumeración más rápida de microorganismos y sus productos en alimentos.

Se puede decir que un método rápido es aquel que proporciona resultados en un tiempo menor al método convencional y que además es sencillo y confiable.

Actualmente en el mercado se encuentran disponibles diferentes productos para la detección rápida y efectiva de microorganismos indicadores en la industria de alimentos. A continuación se hará una descripción de algunos de los nuevos productos:

2.4.1 Placas Petrifilm™: Método microbiológico que consiste en una familia de placas listas para usarse diseñadas para ofrecer ahorro de tiempo, incremento de productividad, fiabilidad y eficiencia. Su diseño tiene una película rehidratable cubierta con nutrientes y agentes gelificantes. Proporciona resultados en tres pasos: inoculación, incubación y recuento. Las Placas Petrifilm™ están disponibles para la mayoría de las necesidades de pruebas microbiológicas incluyendo: recuento de aerobios, recuento de coliformes, recuento de *E.coli* / coliformes, recuento de Enterobacterias, recuento de alta sensibilidad de coliformes, recuento rápido de coliformes, recuento de *Staphylococcus aureus*, recuento de mohos y levaduras y *Listeria* en ambientes.

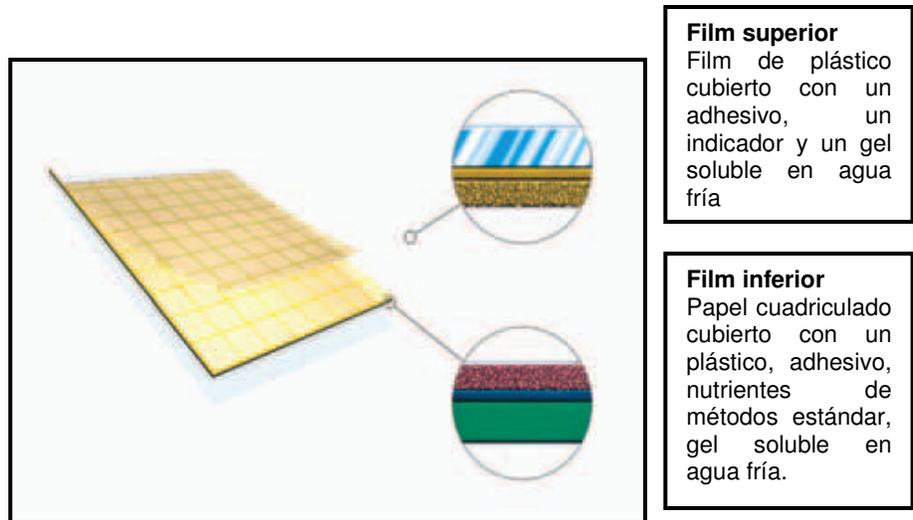


Figura1. Diseño Placa Petrifilm™.

Fuente: 3M

2.4.1.1 Placa Petrifilm™ para el recuento de Aerobios Mesófilos y Bacterias Ácido Lácticas

Son un medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene nutrientes del *Agar Standard Methods*, un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador de color rojo (tetrafenil tetrasolium clorado TTC) que facilita el recuento de las colonias. Las Placas Petrifilm AC se utilizan para el recuento de la población total existente de bacterias aerobias en productos, superficies, etc. (3M, 2006)

Las Placas Petrifilm™ para el Recuento de Aerobios, en combinación con caldo MRS como diluyente e incubación anaeróbica, permiten el crecimiento de bacterias ácido lácticas heterofermentativas (productores de gas) y homofermentativas. Las colonias son de color rojo a rojizo-café, y pueden tener o no una burbuja de gas asociada. El diluyente MRS proporciona un fondo sombreado que resalta la producción de gas de los organismos heterofermentativos. (3M, 2006)

2.4.1.2 Placa Petrifilm™ para el Recuento de Coliformes.

Las Placas Petrifilm™ para el Recuento de Coliformes (Coliform Count, CC) contienen nutrientes de Bilis Rojo-Violeta, (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, y un indicador tetrazolium, que facilita el recuento de las colonias. La película superior atrapa el gas producido por los coliformes fermentadores de lactosa.

La AOAC Internacional y el Manual de Análisis Bacteriológico (BAM) de la FDA de los Estados Unidos definen los coliformes como colonias de bastoncillos gram-negativos que producen ácido y gas durante la fermentación metabólica de la lactosa. Las colonias de coliformes crecen en la Placa Petrifilm™ CC y producen un ácido que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH. El gas atrapado alrededor de las colonias rojas de coliformes confirma su presencia. (3M, 2006).

2.4.1.3 Placa Petrifilm™ para el Recuento rápido de Coliformes

La placa Petrifilm™ de Recuento Rápido de Coliformes es un medio de cultivo listo para usar que contiene nutrientes bilis rojo violeta con lactosa (VRBL), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de pH para la detección de ácidos y un indicador de tetrazolio que facilita el recuento de las colonias. Los primeros resultados de coliformes pueden empezar a aparecer en tan solo seis horas de incubación y se manifiestan como zonas ácidas amarillas discretas con o sin colonias. El recuento total de coliformes se determina a las 24 horas. (3M, 2006)

2.4.1.4 Placa Petrifilm™ para Recuento de *E. coli* / Coliformes

La placa Petrifilm™ para Recuento de *E.coli* y coliformes está compuesta por una lámina de papel con una cuadrícula impresa recubierta de polipropileno conteniendo nutrientes del medio VRBG, el indicador 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónido (BCIG) y un agente gelificante soluble en agua fría (El área

donde se desarrollarán los microorganismos está definida por una película intermedia de espuma). Se complementa en la parte superior con otra lámina de polipropileno que contiene gel soluble en agua fría y tricloruro de trifenil tetrazolio (ó TTC) como indicador. (3M, 2008)

La mayoría de las *E.coli* (cerca del 97%) produce beta-glucuronidasa, la que a su vez produce un precipitado azul asociado con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por la lactosa que fermentan *E.coli* y Coliformes. Cerca del 95% de *E.coli* produce gas, representado por colonias entre azules y rojo-azules asociadas al gas atrapado, mientras que los Coliformes son colonias rojas asociadas con burbuja de gas. (3M, 2008)

Estas placas se incuban por 24 ± 2 horas a 35°C para cuantificar Coliformes y *E. coli* en carne, aves y mariscos y 48 ± 2 horas a 35°C para cuantificar *E. coli* en lácteos. Las placas Petrifilm para *E. coli* y coliformes pueden ser usadas para la enumeración de estos organismos en alimentos diversos así como para el monitoreo ambiental y superficial en áreas de procesamiento y manipuladores. (3M, 2006)

2.4.1.5 Placa Petrifilm™ para Recuento de Mohos y Levaduras

La placa Petrifilm™ de Recuento de Mohos y Levaduras es un medio de cultivo listo para usar que contiene nutrientes enriquecidos con antibióticos, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador para proporcionar contraste y facilitar el recuento. Un pigmento indicador colorea las colonias de levaduras y mohos para proporcionar contraste y facilitar el recuento. Las levaduras son colonias típicamente pequeñas, con relieve, de color verde azulado y con bordes delimitados. Los mohos son, a menudo, colonias planas más grandes, de diversos colores, con bordes no definidos y focos centrales. (3M, 2005)

Estas placas determinan la población de Mohos y Levaduras en un periodo de 3 a 5 días y necesitan una temperatura de incubación de 25 a 27 °C. Pueden ser usadas para la enumeración de estos organismos en diversos alimentos y materias primas así como para el monitoreo ambiental y superficial en áreas de procesamiento.

2.4.1.6 Placa Petrifilm™ para el Recuento de Enterobacterias

La Placa Petrifilm™ para el Recuento de Enterobacterias, contiene nutrientes del medio VRBG modificado que facilita la enumeración de colonias, las cuales son indicadores de condiciones higiénicas después del procesamiento de alimentos. Un colorante indicador en la placa tiñe las colonias de rojo y la capa superior atrapa el gas producido por algunas bacterias. Las bacterias que producen gas y/o ácido se consideran presuntivamente como Enterobacterias y al crecer en la placa presentan una de las siguientes características: 1) Colonias asociadas a burbujas de gas y sin zonas ácidas, 2) Colonias con zonas amarillas de ácido y sin producción de gas, 3) Colonias que producen gas y ácido. (3M, 2006)

Las Enterobacterias son de gran importancia, ya que estos organismos están involucrados con la descomposición de alimentos, son indicadores de contaminación fecal y algunas de ellas son consideradas patógenas. Las Placa Petrifilm™ para Recuento de Enterobacterias enumeran a todos los organismos coliformes además de patógenos potenciales como *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*, entregando de esta manera un panorama más inclusivo de potencial contaminación. (3M, 2006)

2.4.1.7 Placa Petrifilm™ Staph Express para Recuento de *Staphylococcus aureus*

El sistema de recuento 3M Petrifilm™ Staph Express consiste en una placa de recuento Petrifilm Staph Express y un disco Petrifilm Staph Express, la placa de recuento Petrifilm contiene un sistema de medio de cultivo preparado. El medio

cromogénico de Baird-Parker modificado de la placa es selectivo y diferencial para *Staphylococcus aureus*, quien aparece como colonias rojo-violeta en la placa. Otras colonias que no sean de color rojo-violeta también pueden aparecer en la placa. (3M, 2006)

El disco Petrifilm Staph Express ha sido diseñado para la detección de las reacciones de desoxiribonucleasa (DNasa) específicas de *Staphylococcus aureus* aislado en la placa de recuento Petrifilm Staph Express; contiene azul-O toluidina que facilita la visualización de las reacciones de DNasa. El disco Petrifilm Staph Express debe de usarse siempre que aparezcan en la placa otras colonias que no sean de color rojo-violeta.

2.4.1.8 Placa Petrifilm™ para el monitoreo de *Listeria* en ambientes

Las Placa Petrifilm™ para el Monitoreo de *Listeria* en Ambientes son un medio de cultivo listo para usarse que contiene agentes selectivos, nutrientes, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador cromogénico que facilita la detección de colonias en 30 horas. Las placas pueden ser utilizadas para la identificación de o conteo de *Listeria* en muestras de ambientes y/o superficies. (3M, 2005)

Las Placas Petrifilm™ detectan las siguientes especies de *Listeria*: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi*, *Listeria murrayi* y *Listeria welshimeri*, sin embargo no diferencian estos organismos entre sí. Las condiciones ambientales o los sanitizantes pueden atravesar y/o dañar a los microorganismos. El agua de peptona tamponada se utiliza como caldo de reparación en conjunto con la Placa Petrifilm. Dicho paso de reparación de en agua de peptona tamponada no es un paso de enriquecimiento. (3M, 2005)

La Placa Petrifilm™ no requiere pasos de enriquecimiento: detecta la cantidad de *Listeria* presente en la muestra sin necesidad de incrementar el número de células presentes. Con un paso sencillo de reparación (1 hora) y la posterior

incubación (28 ± 2 horas), se puede visualizar la *Listeria spp.* como colonias rojo violeta en la Placa Petrifilm™ (3M, 2005)

El método de placa Petrifilm™ puede ser utilizado como prueba cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa.

- ☞ Interpretación cualitativa: Se ha detectado o no *Listeria* en esta placa (ausencia / presencia)
- ☞ Interpretación semi-cuantitativa: El nivel de *Listeria* debe registrarse con categorías que tengan un significado para las áreas de muestreo y los estándares individuales de su planta (Alto, Medio, Bajo).
- ☞ Interpretaciones cuantitativas: Número de colonias de *Listeria* presentes en la placa.
- ☞ Se debe utilizar un procedimiento consistente cada vez que se tome la muestra (usar el mismo dispositivo de toma de muestra, área de plantilla, técnico y técnicas de muestreo).
- ☞ El tamaño de área de muestreo deberá basarse en regulaciones, estándares internos, y/o ubicación de la toma de la muestra. Por ejemplo, se debe muestrear un área más grande en una línea de producto terminado, debido a que el número de bacterias que se espera encontrar es bajo. (3M,2004)

2.4.2 Rida®count: Es una prueba de lámina con medio listas para usar, diseñadas para la detección cuantitativa de microorganismos en alimentos y ambientes que consisten en una película deshidratada de medios generales o selectivos en las cuales se deposita 1 ml de muestra, la cual rehidrata el medio, posee una cubierta transparente que evita la contaminación indeseada. Este producto esta diseñado para el recuento de Mesófilos Aerobios, Coliformes totales, Enterobacterias, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella* y Hongos y levaduras. (Corporación Chisso, 2003).

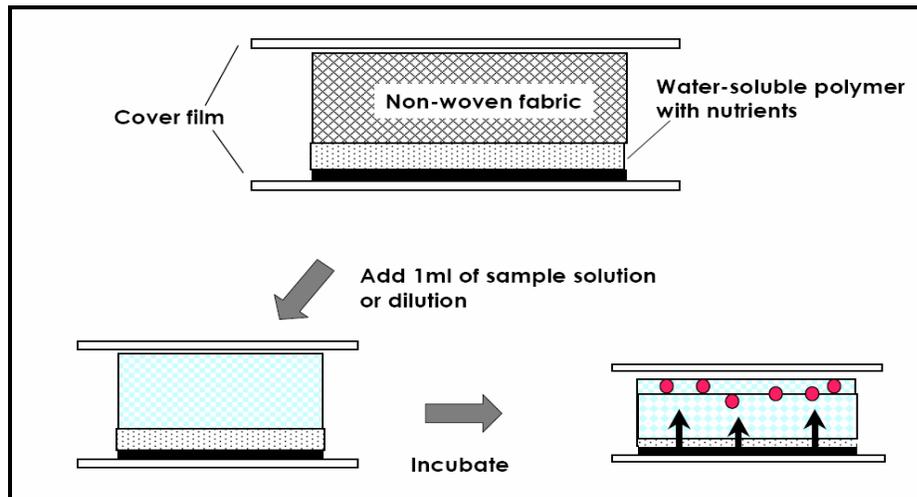


Figura 2. Estructura de Rida count

Fuente: Corporación Chisso

2.4.2.1 Rida[®] count para recuento de Mesófilos aerobios:

La lamina Rida[®] count para la enumeración de mesófilos aerobios consiste en una película para la detección cuantitativa de bacterias aerobias en una gran variedad de alimentos, excepto aquellos alimentos con colorantes.

La base de la detección es la reducción del TTC y la producción de color rojo como producto de la respiración de las bacterias. Esta lámina contiene medio Plate Count modificado deshidratado y un indicador de color rojo (tetrafenil tetrasolium clorado TTC), necesita un tiempo de incubación de 24 a 48 horas y una temperatura de 35° C que facilita el recuento de las colonias. El indicador presente en el medio permite visualizar las colonias de color rojizo. (R-Biopharm, 2006)

2.4.2.2 Rida[®] count para recuento de coliformes totales:

La base de la detección de coliformes consiste en la hidrólisis del 5- Bromo-4-Cloro-3-indolil- β -D-Galactopiranosido o X-Gal por la enzima β - galactosidasa de

las bacterias coliformes y la producción de un color azul. Consiste en una lámina que contiene nutrientes del medio cultivo VRB (bilis rojo violeta) y un indicador cromógeno X- Gal para la detección de coliformes totales. Necesita 1 ml de muestra para la hidratación del medio. Estas placas se incuban por 24 ± 2 horas a 35°C , para poder observar las colonias, las cuales aparecen de un color azul correspondientes a coliformes o color verde indicando la presencia de coliformes con alto metabolismo (producción de ácido) o baja actividad de enzima (células lesionadas). (R-Biopharm, 2006)

2.4.2.3 Rida[®] count para recuento de *Escherichia coli*:

La lamina Rida[®] count para la enumeración de *E. coli*, consisten en una película con medio VRBA deshidratado, contiene como indicador X-Glucoronido, el cual es degradado por *E. coli* quien tiene esta capacidad debido a su enzima β -D--glucuronidasa. Estas placas se incuban por un periodo de 24 a 48 horas a 35°C . Las colonias de *E.coli* se observan de un color azul. (R-Biopharm, 2006)

2.4.2.4 Rida[®] count para recuento de Hongos y Levaduras:

La lamina Rida[®] count para la enumeración de de mohos y levaduras consisten en una película que contiene nutrientes enriquecidos, YGC modificado y como agente indicador estearasa. Estas placas requieren de un periodo de incubación de 3 a 5 días a 25°C , para poder observar colonias azul verdosas, se diferencian por la morfología típica. (R-Biopharm, 2006)

2.4.2.5 Rida[®] count para recuento de *Staphylococcus aureus*:

La lamina Rida[®] count para la enumeración de *Staphylococcus aureus* consiste en una película deshidratada de medio manitol salado modificado, con fosfatasa como agente inhibidor. Las placas deben ser incubadas por 24 horas a una

temperatura de 35° C. Las colonias típicas de *S. aureus* se observan de color verde azulado. Se debe realizar confirmación bioquímica una vez realizada la purificación de una colonia aislada. (R-Biopharm, 2006)

2.4.2.6 Rida® count para recuento de *Salmonella*:

La lamina Rida® count para la enumeración de *Salmonella* es una película que contiene agar XLD modificado y deshidratado, necesitan de un periodo de incubación de 24 a 48 horas a 35°C. El sulfuro de hidrogeno generado por *Salmonella* es detectado por colonias de color negro. Posterior al tiempo de incubación, se debe realizar su confirmación bioquímica tradicional a partir de una colonia aislada. No se puede detectar la no generación de sulfuro de hidrogeno. (R-Biopharm, 2006)

2.4.3 Medios cromogénicos: Son medios diseñados a partir de sustratos cromógenos para la identificación de diferentes microorganismos en alimentos. Estos medios están fundamentados en la actividad enzimática sobre los sustratos, los cuales al ser degradados generan una coloración especial en la colonia. Actualmente se encuentran en el mercado diferentes medios disponibles como: Chromocult Merck, Cromogenico Oxoid, coli ID de Biomeraux, BioPro Premium de 3M.

2.4.3.1 Chromocult E. coli / Coliformes Merck:

El agar Chromocult es un medio selectivo para la detección simultánea de coliformes totales y *Escherichia coli* en agua potable y muestras alimentos procesados. El sustrato cromógeno contenido en Chromocult® da un color claramente distinguible a cada tipo de colonia separada, permitiendo una clara identificación y evitando así errores de recuento. (Merck, 2002)

En primera instancia, la interacción de las peptonas, piruvato, sorbitol y el buffer fosfato garantizan un crecimiento rápido de las colonias. El crecimiento de las bacterias Gram positivas así como el de algunas Gram negativas se ve inhibido por el contenido de Tergitol 7, el cual no presenta efecto negativo sobre el crecimiento de las bacterias coliformes. (Merck, 2002)

Para la segunda etapa, Merck ha desarrollado una nueva combinación de dos sustratos cromogénicos que permiten la detección simultánea de coliformes totales y *Escherichia coli*. El sustrato salmón GAL es empleado para la detección de coliformes totales por la producción de β galactosidasa, las colonias se observan de color rojo salmón. (Merck, 2002)

El sustrato X-glucuronido es usado para la identificación de β -glucuronidasa, la cual es característica de *E. coli*, quien es capaz de transportar ambos sustratos, a fin de que sus colonias tomen un color de azul oscuro a violeta. Como parte de un confirmación adicional de *E. coli*, la inclusión del triptofano permite detectar la producción de indol, lo que aumenta la fiabilidad de detección cuando se emplea la combinación de Salmón-GAL y X-glucuronido. (Merck, 2002)

Tabla 1. Composición (g/l) Agar Chromocult de Merck.

| Chromocult: Composición (g/l) | |
|--------------------------------------|----------------|
| Peptonas | 3 g/l |
| Cloruro de sodio | 5 g/l |
| Dihidrogenofosfato potásico | 1,7 g/l |
| Hidrógenofosfato dipotásico | 3 g/l |
| Piruvato sodico | 1 g/l |
| Triptofano | 1 g/l |
| Agar agar | 12 g/l |
| Sorbitol | |
| Tergitol | |
| Mezcla cromogénica | 0,2 g/l |

2.4.3.2 Medio Cromogénico *E. coli* / Coliformes OXOID

Medio cromogénico que ayuda a la diferenciación entre las colonias de *Escherichia coli* y otros coliformes presentes en alimentos y muestras ambientales. La base de este medio esta en el uso de dos enzimas sustrato para diferencias entre *E.coli* y coliformes. Uno de los sustratos cromogénicos es transportado por la enzima glucuronidasa que es específica para *Escherichia coli* y producida por aproximadamente por el 97% de las cepas. El segundo sustrato cromogénico es transportado por la galactosidasa, una enzima producida por la mayoría de los coliformes. Esto se traduce en colonias púrpuras correspondientes a *Escherichia coli*, ya que son capaces de tomar ambos sustratos cromogénicos y las colonias rosa corresponden a coliformes, ya que sólo están en condiciones de la tomar el cromógeno galactosidasa.

TABLA 2. Composición (g/l) del medios Cromogénico *E. coli* / Coliformes OXOID

| Cromogénico Oxoid: Composición (g/l) | |
|---|----------|
| Mezcla cromogénica | 20.3 g/l |
| Extracto de levadura | 3.0 g/l |
| Peptona | 5.0 g/l |
| Lactosa | 2.5 g/l |
| Cloruro de sodio | 5.0 g/l |
| D-hidrógeno fosfato de sodio | 3.5 g/l |
| D-hidrógeno fosfato de potasio | 1.5 g/l |
| Rojo neutro | 0.03 g/l |
| Agar | 15.0 g/l |
| pH 7.0 ± 0.2 / 25°C | |

2.4.3.3 Coli ID bioMérieux

Medio cromogénico selectivo para la detección y recuento de *E.coli* β D glucuronidasa positivo a 44° C, y recuento simultáneo de *E.coli* y otros coliformes a 37° C, a partir de muestras alimenticias.

Contiene dos sustratos cromogénicos: uno para la detección de β D glucuronidasa (*E.coli*) produciendo colonias rosas y otro para la detección de galactosidasa (otros coliformes) dando colonias azules. La combinación de estos dos sustratos optimiza la detección de *E.coli* y coliformes. La mayoría de las bacterias gran positivas son inhibidas. (BioMérieux, 2008)

TABLA 3. Composición (g/l) medio cromogénico Coli ID bioMerieux.

| Coli ID: Composición (g/l) | |
|---|------|
| Gelatina de peptona bovina o porcina..... | 7g |
| Extracto de levadura..... | 3g |
| Cloruro sódico..... | 5g |
| Sales biliares | 1.5g |
| Mezcla de activadores..... | 0.3g |
| Mezcla de sustratos cromogénicos..... | 0.3g |
| Agar... | 1.5g |
| Agua purificada..... | 1L. |

2.5 ENTIDADES DE REGULACION NACIONAL E INTERNACIONAL

2.5.1 AOAC: ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES

La AOAC es una asociación científica con 120 años de antigüedad, formada por numerosos científicos miembros de más de 90 países, cuya finalidad es la confianza a nivel mundial en los resultados analíticos. La Asociación, se dedica al desarrollo y validación de métodos en ciencias analíticas y mejorar los programas de aseguramiento de calidad de los laboratorios. (3M, 2005)

Esta asociación participa activamente en asuntos regulatorios de nuevos métodos y técnicas, es líder internacional en los procesos de evaluación de Métodos Analíticos que abarcan temas como inocuidad alimentaria, materiales de agricultura, alérgenos en alimentos y desinfectantes.

Para cumplir sus objetivos, la AOAC cuenta con dos distintos programas de validación de Métodos, cuya diferencia radica tanto en la minuciosidad de los requisitos para la evaluación, como en los alcances de confianza de aprobación:

- Programa de Métodos Probados en su Desempeño (AOAC[®] Performance Tested MethodsSM).
- Programa de Métodos Oficiales AOAC (AOAC[®] Official Methods Program[®]).

2.5.1.1 Programa de Métodos Probados en su Desempeño: Administrado por el Instituto de Investigación de la AOAC (AOAC Research Institute, RI), este programa se aplica cuando se necesita una validación rápida y con cierto grado de confianza. Se evalúan las características declaradas por el fabricante del Método y la validación la otorga un solo laboratorio independiente. (AOAC, 2008)

2.5.1.2 Programa de Métodos Oficiales (OMA): El OMA es el programa más completo de la AOAC y consiste en una validación multi- laboratorios de los métodos comerciales con el más alto grado de confianza en el desempeño, para generar resultados creíbles, defendibles y reproducibles. (AOAC, 2008)

Reconocidos internacionalmente como “Estándar de Oro”, por el riguroso cuidado de sus pruebas y caracterización, los Métodos AOAC son aceptados y reconocidos por agencias regulatorias y organizaciones de todo el mundo. En particular, quedaron definidos como “oficiales” en las regulaciones promulgadas en la Ley de Drogas, Cosméticos y Alimentos de los Estados Unidos (Food, Drug and Cosmetic Act, Título 9 de las Regulaciones de la USDA - FSIS).

En términos generales, el proceso para obtener una Aprobación AOAC comienza por los resultados de todos los laboratorios independientes que participan en la evaluación, a partir de un Método de Referencia de la AOAC (Método Interno de Validación). Posteriormente se realiza un comparativo entre el Método de Referencia y los resultados de todos los laboratorios, que se publican en un Estudio Colaborativo del Journal de la AOAC Internacional, donde pueden ser consultados.

Inicialmente, un Método Oficial AOAC se publica con Aprobación “First Action”. Dos años después de haber obtenido la primera aprobación, el Método vuelve a ser evaluado por un comité y, si no hay reclamos por parte de los usuarios en cuanto a su desempeño, se obtiene la Aprobación definitiva “Final Action”.

Los requisitos para obtener una Aprobación como Método Oficial AOAC son:

- Tiempo promedio del proceso de validación: 12 meses como mínimo.
- Número de laboratorios independientes que evalúan el método: entre 8 y 10 como mínimo.
- Revisión de datos del Método Interno de Validación.
- Publicación de resultados en el Journal de la AOAC Internacional.
- Incorporación del Método en el Código Federal de Regulaciones en EUA.
- Revisión estadística y de seguridad por la AOAC.
- Publicación del Método en los Métodos Oficiales de Análisis de la AOAC Internacional.
- El costo por validación oscila entre \$35,000 y \$20,000 USD. (3M, 2005)

2.5.2 FDA: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION

La FDA es la agencia del gobierno de los Estados Unidos responsable de proteger la salud pública de garantizar la seguridad, eficacia de todos los

productos alimenticios y sus derivados con excepción de los productos procesados a partir del huevo y de las carnes y las aves y de el agua embotellada, igualmente establece las regulaciones de medicamentos, aparatos médicos, cosméticos, productos biológicos y productos hemáticos. FDA se asegura que todos estos productos están etiquetados con veracidad con la información que la gente necesita para utilizarlos de manera adecuada. (FDA, 2008)

Los controles y las sanciones legales: Los inspectores de la FDA recogen muestras de productos tanto nacionales como importados para realizarles exámenes científicos y controles a las etiquetas. Si una empresa se encuentra en violación de una ley que impone la FDA, esta le sugiere a las empresas tomar acciones correctivas, y si el producto sigue demostrando un riesgo para el consumidor, la FDA tiene sanciones legales a las cuales puede asistir. Se acude a los tribunales para obligar a una empresa a dejar de vender un producto y los productos que estén en el mercado son incautados y destruidos. Las sanciones legales incluyen la prisión y el cierre definitivo de la empresa.

2.2.5.2 Seguridad de los productos alimenticios: La FDA realiza pruebas a los alimentos para verificar que no haya ninguna sustancia, como residuos de plaguicidas en cantidades inaceptables. Si se detectan contaminantes, la FDA toma medidas correctivas. La FDA establece normas de etiquetado para informar a los consumidores sobre los alimentos que compran.

2.2.5.3 Seguridad de los productos alimenticios para animales de granja y los medicamentos para animales: La FDA también es responsable de la verificar los medicamentos para los animales que son utilizados en las empresas de procesamiento de carnes, evitando poner en riesgo la salud pública. La FDA

se asegura que en la etiquetas de los productos alimenticios para animales suministre la información necesaria para su utilización.

2.2.5.4 Seguridad de productos biológicos: la FDA también garantiza la pureza y la eficacia de productos biológicos (preparados farmacéuticos elaborados a partir de organismos vivos y sus productos), como la insulina y las vacunas.

2.2.5.5 Aprobación de nuevas drogas: La FDA requiere que las drogas, tanto de prescripción y de venta libre – demuestren ser segura y eficaces. A la hora de decidir si aprueba los nuevos medicamentos, la FDA no hacer la investigación en sí, sino que examina los resultados de estudios realizados por el fabricante. La FDA debe determinar que el nuevo medicamento produce los beneficios para lo cual fue desarrollado, sin causar efectos secundarios que superen los beneficios.

2.2.5.6 Cosméticos, colorantes y aditivos: la FDA puede retirar del mercado los cosméticos peligrosos. Los colorantes y otros aditivos utilizados en medicamentos, alimentos y cosméticos también están sujetos a control por parte de la FDA. El organismo debe revisar y aprobar estas sustancias antes de que puedan ser utilizados.

2.2.5.7 Seguridad de los productos sanitarios: Estos son clasificados y regulados por la FDA en función de su grado de riesgo para el público en general. Los dispositivos que son de apoyo para mantener la vida o implantes, como marcapasos, deben recibir por parte de la FDA la aprobación antes de que puedan ser comercializados.

La FDA tiene funciones relacionadas con otros organismos gubernamentales entre los cuales se encuentran:

FTC: La Comisión Federal de Comercio es la agencia federal que regula todos los anuncios en el producto, con exclusión de los medicamentos con receta y dispositivos médicos. FTC asegura que los anuncios sean veraces y no engañosos para los consumidores.

EPA: la Agencia de Protección Ambiental tiene la responsabilidad de desarrollar normas nacionales para el abastecimiento de agua potable. FDA regula el etiquetado y la seguridad de agua embotellada (FDA,1999)

2.5.3 FSIS: FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE

Organismo de salud pública en los EE.UU del Departamento de Agricultura responsable de asegurar que la oferta comercial de la nación de carne, el pollo, los huevos y sus productos son seguros, sanos, y correctamente etiquetados y envasados

El FSIS (Servicio de Inspección e Inocuidad de Alimentos del Departamento de Agricultura de EE. UU.), inició su programa de Reducción de Patógenos y HACCP en 1996. El año 2000 todos los establecimientos elaboradores de productos cárnicos, desde mataderos hasta fábricas de cecinas, debían desarrollar sus actividades en el marco de un plan HACCP. La Administración del FSIS ha fijado los siguientes cinco objetivos al Programa:

- Mejorar la gestión y efectividad de los programas de inspección reglamentarios.
- Asegurar que las decisiones de políticas tienen una base científica.
- Mejorar la coordinación de las actividades de inocuidad de alimentos con otras agencias de salud pública.
- Fortalecer la educación pública.
- Proteger a los productos regulados por el FSIS de la contaminación intencional

El FISI define en tres secciones las actividades relacionadas con la inocuidad de los productos avícolas:

2.5.3.1 Inspección de Productos Avícolas: Esta sección todavía mantiene gran parte de las actividades tradicionales de inspección, como las inspecciones pre y posmortem. Define un término que se utiliza frecuentemente en el léxico de inspección del FSIS: *producto adulterado*. Un producto se considera adulterado cuando contiene cualquier sustancia que lo altere, sea ésta de naturaleza química o de otro tipo, que lo contamine y lo haga peligroso para la salud del consumidor. También se aplica este concepto a los productos que en forma maliciosa han sido modificados para aumentar su peso o volumen, así como cuando por malas prácticas de elaboración han sido contaminados o cuando se entrega información falsa en el etiquetado. Al mencionar contaminación de tipo químico, esta regulación expresamente cita productos como los pesticidas, colorantes y aditivos alimenticios.

Otros ejemplos de adulteración se refieren a productos que estén parcial o totalmente sucios, descompuestos -incluso podridos- o que presenten cualquier alteración que los haga insalubres o no aptos para el consumo público; o también, si el producto proviene de aves mortecinas o ha sido envasado en condiciones que afecten la salubridad de la carne.

En el sistema de inspección del FSIS, en que gran parte de las actividades de la planta faenadora son verificadas por el equipo de calidad de la empresa, se distinguen dos tipos de situaciones que tienen que ver con faltas o deficiencias:

- El incumplimiento, que es el no cumplimiento de un precepto legal o reglamentario que se detecta como consecuencia de la actividad de inspección;

- La desviación, situación que se produce cuando no se cumplen los límites críticos definidos en el plan HACCP de la empresa para un punto crítico de control.

2.5.3.2 Medidas Higiénicas y de Aseo: Bajo esta sección se incluyen todas las actividades que de alguna forma tienen relación con aspectos ambientales como: el lugar donde se ubica la planta; las construcciones incluyendo muros, pisos, techos, ventanas, puertas y los materiales que se utilicen en la construcción; la iluminación; la ventilación del edificio; todo el sistema de plomería; el sistema de alcantarillado; el aprovisionamiento de agua y hielo; el agua que es reutilizada; los guardarropas, vestuarios y servicios higiénicos del personal; la higiene del personal y de su ropa de trabajo; la salud de los empleados; el control de plagas y vectores, y los equipos y utensilios de trabajo.

El FSIS ha definido un procedimiento de inspección para los Estándares de Desempeño Higiénico (Sanitation Performance Standard, SPS), el cual se define como el conjunto de resultados que debe alcanzar la planta desde el punto de vista de limpieza e higiene. Estos resultados son exigidos por la reglamentación, pero los métodos para alcanzarlos son definidos por el establecimiento.

Un importante requisito que se le exige a los establecimientos desarrollar son los Procedimientos Operacionales Estandarizados de Sanitización (Sanitation Standard Operation Procedures, SSOP). Éstos deben describir documentadamente todas las actividades de limpieza que el establecimiento efectúe diariamente antes (aseo preoperacional) y durante las operaciones (aseo operacional) diarias de faena o procesamiento, para mantener las condiciones de higiene que eviten o prevengan la contaminación o adulteración del producto.

Los SSOPs deben estar definidos en un manual que debe contemplar su implementación, mantenimiento, las acciones correctivas cuando se producen desviaciones del proceso y los sistemas de registro de las actividades de limpieza. El manual SSOP debe estar firmado y actualizado por un funcionario que cuente con autoridad y respaldo por la gerencia de la planta.

El FSIS verifica que los procedimientos sean adecuados, efectivos y cumplan lo definido en la reglamentación. El proceso de verificación incluye:

- Revisión de los SSOPs
- Revisión de los registros diarios de implementación de los SSOPs y las acciones correctivas que se hayan tomado o que se determine que deben tomarse.
- Observación directa de cómo se ejecutan los SSOPs incluyendo las acciones correctivas.
- Observación directa para estimar o evaluar las condiciones higiénicas del establecimiento.
- El FSIS fiscaliza el cumplimiento de ambos grupos de requisitos reglamentarios (SPS y SSOP).

2.5.3.3 Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP):

Esta sección cubre las exigencias que el sistema FSIS de inspección ha establecido en relación a que las plantas implementen planes HACCP. En este contexto, todos los establecimientos deberán efectuar análisis de riesgo para determinar la probabilidad de que determinados peligros biológicos, físicos o químicos puedan estar presentes durante el proceso de faenamiento, o posterior elaboración, e identificar las medidas preventivas para controlar dichos peligros. El análisis de peligros debe incluir todos los peligros para la inocuidad del alimento que puedan presentarse antes, durante y después que el producto haya sido elaborado.

Se entiende por peligro que tiene una probabilidad razonable de ocurrir, aquel para el cual, un establecimiento cauto y responsable establece controles, debido a que existen antecedentes históricos de ocurrencia, o porque hay publicaciones

que indican que en determinado tipo de producto hay mayor probabilidad de que éstos se produzcan si no hay algún tipo efectivo de control.

Esta regulación entrega una serie de definiciones, como la de *Puntos Críticos de Control (PCC)*, que se refiere al punto, paso o procedimiento en un proceso de elaboración de alimentos en el cual, mediante un proceso de control, se puede prevenir o eliminar un peligro de inocuidad, o bien reducirlo a un nivel aceptable para la salud del consumidor. (FSIS, 2008)

2.5.4 AFNOR: ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION

Asociación Francesa de Normalización es el principal organismo de certificación en Francia. La validación AFNOR consiste en un completo sistema de certificación independiente de Europa, que operan junto con la validación técnica de los sistemas de NordVal (sistema de validación de 5 países nórdicos) y AOAC. Este sistema de validación riguroso garantiza que los resultados obtenidos con los métodos comerciales son equivalentes a los resultados obtenidos con métodos normalizados. (AFNOR, 2008)

LA AFNOR emplea el protocolo de validación para métodos alternativos descrito en la norma EN ISO 16140. En 1989 a petición de la industria de alimentos y de las autoridades participantes, AFNOR estableció un sistema de certificación de los métodos utilizados en la industria, esta certificación inicialmente se llamo “validación AFNOR de métodos de análisis alternativos”. (AFNOR, 2008)

Las condiciones generales en virtud de la cual esta marca se concede, son las de cumplir con todos los requisitos del reglamento europeo (EC) 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, con lo que automáticamente se obtiene un reconocimiento europeo. (AFNOR, 2008)

Todos los métodos son evaluados en dos etapas:

1. Aplicar un estudio completo de validación por un laboratorio experto independiente, de acuerdo con un protocolo estandarizado.
2. Aplicar una auditoria en la planta de producción con el fin de evaluar el método a ser validado.

Conforme con las normas de certificación, la validación AFNOR es emitida por un período de 4 años. Adicionalmente, los métodos comerciales validados son monitoreados por medio de auditorias periódicas. Después de este período de 4 años, Se lleva a cabo un estudio técnico de renovación. (AFNOR, 2008)

Todas las solicitudes de validación sin excepción son examinadas por un grupo de expertos en microbiología lo cual garantiza una evaluación exhaustiva y detallada de la aplicación de cada método. La AFNOR ha validado alrededor de 70 métodos comerciales para los análisis microbiológicos en alimentos, la mayoría de estos basados en la detección de *Salmonella*, *Listeria*, coliformes, etc. (AFNOR, 2008)

2.5.5 USDA: UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE

El Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos es una unidad ejecutiva del Gobierno Federal de EE.UU. Su propósito es desarrollar y ejecutar políticas de ganadería, agricultura, alimentación. Su meta es atender las necesidades de los productores (granjeros, rancheros), promoviendo el comercio agrícola y la producción, trabajando para asegurar seguridad alimentaria (responde por la seguridad de los productos derivados de la carne de res, la carne de pollo y los huevos), protegiendo los recursos naturales, mejorar las comunidades rurales. (USDA, 2008)

2.5.5.1 El Servicio de Comercialización Agrícola: (AMS) es una de las divisiones del ministerio de agricultura de los Estados Unidos y tiene seis áreas a su cargo: el algodón, lácteos, frutas y hortalizas, ganado y semillas, las aves de corral, y el tabaco. La AMS debe estar al tanto que se cumpla la normatividad, clasificación y comercialización de servicios para los productos básicos, y supervisar los acuerdos de comercialización. La AMS impone ciertas leyes federales como la Ley Federal de Semillas.

AMS suministra información técnica de comercialización y transporte de alimentos a los productores, a los transportistas, los exportadores, las comunidades rurales, agencias gubernamentales y universidades. El programa también administra un programa de subsidios financieros para mejorar la comercialización en los Estados Unidos.

2.5.5.2 El Servicio de Investigación Agrícola (ARS) es la principal delegación de investigación del (USDA). Lleva a cabo investigaciones para desarrollar y aportar soluciones a problemas agrícolas de alta prioridad nacional y proporcionar acceso a la información y difusión a:

- Garantizar una alta calidad, la inocuidad de los alimentos y otros productos agrícolas
- Evaluar las necesidades nutricionales de los estadounidenses
- Sostener una economía agrícola competitiva
- Aumentar la base de recursos naturales y el medio ambiente
- Proporcionar oportunidades económicas para los ciudadanos rurales, las comunidades y la sociedad en su conjunto.

2.5.5.3 El Centro de Políticas y Promoción de la Nutrición (CNPP), organización del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, fue creado en 1994 para mejorar la nutrición y el bienestar de los norteamericanos. En función de esta finalidad, el Centro concentra sus esfuerzos en dos objetivos principales: Fomentar y promover guías alimentarias para todos los norteamericanos, y Llevar a cabo análisis e investigaciones aplicadas en nutrición y economía del consumidor.

Los principales productos del Centro para apoyar sus objetivos son los siguientes:

- Las Guías Alimentarias para los Norteamericanos
- Sistema de Orientación Alimenticia MiPirámide
- Índice de Alimentación Saludable
- Planes de Alimentación de los Estados Unidos
- Contenido Nutricional del Suministro de Alimentos de los Estados Unidos
- Gastos en Niños por Familia

2.5.5.4 El Servicio Agrícola Exterior (FAS) tiene la responsabilidad primordial el desarrollo de programas del mercado en el exterior, los acuerdos internacionales de comercio y las negociaciones, y la recopilación de estadísticas e información sobre el mercado. El USDA garantiza crédito a los exportadores y desarrolla los programas de ayuda alimentaría y ayuda a aumentar los ingresos y la disponibilidad de alimentos en los países en desarrollo mediante la movilización de personal experto en agricultura que condujo al crecimiento económico.

2.5.6 APHA: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION

Fundada en 1872, la APHA es la organización de salud pública más antigua, grande y diversa del mundo. Esta organización tiene como objetivo proteger a todos los estadounidenses y sus comunidades de las amenazas graves para la salud, basándose en la promoción de la salud y actividades de prevención de enfermedades. Igualmente trabaja para garantizar el acceso a la atención de la salud, proteger la financiación de los servicios de salud pública básicos y eliminar las disparidades en la salud entre otros. (APHA, 2008)

2.5.6.1 Las declaraciones políticas

APHA influencia políticas y establece las prioridades en un amplio conjunto de temas, entre ellas la salud de los niños, el acceso a la atención médica, salud ambiental, de cuidado administrado, la infraestructura de salud pública, control de enfermedades, las discrepancias en la salud, el bioterrorismo, la salud internacional y la lucha contra el tabaco. APHA defensores de fondos federales para la salud y los programas de educación profesional en salud pública.

Los miembros de APHA y el personal trabaja en estrecha colaboración con miembros del Congreso, los organismos reguladores y otras organizaciones de salud pública para garantizar que la salud pública es prioritaria en los ámbitos legislativos y proceso de formulación de políticas.

El proceso de desarrollo de la Asociación está diseñado para ser abierto a la plena participación de los miembros, y para garantizar una cuidadosa revisión de las correspondientes juntas de APHA, comités y otras entidades.

La Asociación Americana de Salud Pública representa más de 50 disciplinas en materia de salud pública. Se concentra en la promoción y generar política en torno a tres áreas fundamentales:

- **La reconstrucción de la infraestructura de salud pública**

La financiación federal para importantes programas de salud pública que ha sido objeto de amenazas e incluso de dramáticos cortes de presupuesto, por esto se va visto en la necesidad de educar los miembros del Congreso, y al público sobre el papel vital de los programas de salud pública en los Estados Unidos.

APHA continúa a la cabeza de las actividades de promoción en el Capitolio para informar a los miembros del Congreso sobre el éxito de una financiación adecuada para los programas de salud pública en un esfuerzo por restaurar y aumentar la financiación para la salud pública.

- **El acceso a la atención de la salud**

Todos los estadounidenses merecen amplia cobertura de salud. El gobierno federal proporciona cobertura de salud a algunos norteamericanos a través del Medicare y Medicaid y los programas para algunos niños de bajos recursos a través del programa Seguro de Salud para la niñez.

- **Diferencias en el servicio Salud**

La APHA trabaja con otras entidades gubernamentales para avanzar en una legislación amplia para abordar las causas que evitan que muchas personas tengan acceso a la atención de la salud.

2.5.7 INVIMA: INSTITUTO NACIONAL DE VIGILANCIA DE MEDICAMENTOS Y ALIMENTOS

El Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos INVIMA es un establecimiento público del orden nacional, de carácter científico y tecnológico, con personería jurídica, autonomía administrativa y patrimonio independiente,

perteneciente al Sistema de Salud, adscrito al Ministerio de la Protección Social y con sujeción a las disposiciones generales que regulan su funcionamiento.

Es una institución oficial de vigilancia y control de carácter técnico científico, que trabaja para la protección de la salud individual y colectiva de los Colombianos mediante la aplicación de las normas sanitarias relacionadas con los productos de su competencia.

El INVIMA fue creado mediante el artículo 245 de la Ley 100 del 23 de diciembre de 1993, a través del cual, se establece el Régimen de Seguridad Social en Colombia, sus funciones y organización básica se reglamenta mediante la expedición del decreto 1290 del 22 de junio de 1994. De acuerdo con las funciones conferidas en el Decreto 1290 de 1995, corresponde al INVIMA ejecutar políticas en materia de vigilancia sanitaria y de control de calidad de medicamentos, productos biológicos, alimentos, bebidas, cosméticos, dispositivos y elementos médico – quirúrgicos, odontológicos, productos naturales, homeopáticos y los generados por biotecnología, reactivos de diagnóstico y otros que puedan tener impacto en la salud individual y colectiva. (INVIMA, 2008)

2.5.7.1 Funciones Generales

- Controlar y vigilar la calidad y seguridad de los productos establecidos en el artículo 245 de la Ley 100 de 1993, y en las demás normas pertinentes, durante todas las actividades asociadas con su producción, importación, comercialización y consumo.
- Adelantar los estudios básicos requeridos, de acuerdo con su competencia y proponer al Ministerio de la Protección Social las bases técnicas que este requiera, para la formulación de políticas y normas, en materia de control de calidad y vigilancia sanitaria, de los productos mencionados en la Ley 100 de 1993 y en las demás normas pertinentes.

- Proponer, desarrollar, divulgar y actualizar las normas científicas y técnicas que sean aplicables en los procedimientos de inspección, vigilancia sanitaria, control de calidad, evaluación y sanción; relacionados con los registros sanitarios.
- Coordinar la elaboración de normas de calidad con otras entidades especializadas en esta materia, de acuerdo con la competencia que les otorgue la ley.
- Expedir los registros sanitarios, así como la renovación, ampliación, modificación y cancelación de los mismos, cuando le corresponda, de conformidad con la reglamentación que sobre el particular expedida el Gobierno Nacional con fundamento en el artículo 245 de la Ley 100 de 1993; los registros así expedidos no podrán tener una vigencia superior a la señalada por el Gobierno Nacional en el desarrollo de la facultad establecida en el artículo 245 de la Ley 100 de 1993.
- Delegar en algunos entes territoriales la expedición de los registros sanitarios, así como la renovación, ampliación, modificación, cancelación y otras novedades referidas a los mismos, de conformidad con la reglamentación que expida el Gobierno Nacional con fundamento en el artículo 245 de la Ley 100 de 1993.
- Establecer las directrices operativas y los procedimientos de operación técnica a ejecutarse, en las materias relacionadas con este decreto.
- Capacitar, actualizar, asesorar y controlar a las entidades territoriales en la correcta aplicación de normas y procedimientos previstos en materia de

vigilancia sanitaria y control de calidad, de los productos establecidos en el artículo 245 la Ley 100 de 1993 y en las demás normas pertinentes.

- Promover, apoyar y acreditar instituciones para la realización de evaluaciones farmacéuticas y técnicas, así como laboratorios de control de calidad, asesorarlos y regular su operación de acuerdo con las normas vigentes, sin perjuicio de lo que en materia de control deban adelantar las entidades territoriales.
- Efectuar las pruebas de laboratorio que considere de mayor complejidad a los productos estipulados en el artículo 245 de la Ley 100/93 y en las demás normas pertinentes; desarrollar, montar y divulgar nuevas técnicas de análisis y ejercer funciones como laboratorio nacional de referencia.
- Organizar, dirigir y controlar la red nacional de laboratorios referidos a los productos estipulados en el artículo 245 de la Ley 100 de 1993 y en las demás normas pertinentes y promover su desarrollo y tecnificación.
- Dirigir, coordinar y controlar el diseño, operación y actualización del sistema de información, referido a los registros sanitarios en todo el país.
- Resolver los conflictos que se presenten en desarrollo de las evaluaciones farmacéuticas y técnicas, y en la expedición, ampliación, renovación, modificación y cancelación de los registros sanitarios o de otras novedades asociadas entre los solicitantes y las instituciones acreditadas y delegadas.
- Impulsar y dirigir en todo el país las funciones públicas de control de calidad, de vigilancia sanitaria y epidemiológica de resultados y efectos adversos de los productos de su competencia.

- Identificar y evaluar las infracciones a las normas sanitarias y procedimientos establecidos y adelantar las investigaciones que sean del caso; aplicar las medidas de seguridad sanitaria de ley y las sanciones que sean de su competencia, de conformidad con la Ley 9 de 1979 y remitir a otras autoridades los demás casos que les correspondan.
- Proponer medidas de carácter general para promover la aplicación de las buenas prácticas de manufactura en la elaboración de los productos establecidos en artículo 245 de la Ley 100 de 1993 y en las demás normas pertinentes, así como en su transporte, almacenamiento y en las demás actividades propias de su comercialización.
- Participar y colaborar con la industria y el sector privado en general, en los aspectos de capacitación, actualización, asesoría técnica e intercambio de experiencias e innovaciones tecnológicas.
- Adelantar cuando se considere conveniente, las visitas de inspección y control a los establecimientos productores y comercializadores de los productos establecidos en el artículo 245 de la Ley 100 de 1993 y en las demás normas pertinentes, sin perjuicio de lo que en estas materias deban adelantar las entidades territoriales.
- Autorizar la publicidad que se dirija a promover la comercialización y consumo de los productos establecidos en el artículo 245 de la Ley 100 de 1993, de conformidad con lo dispuesto en la Ley 9 de 1979 y sus decretos reglamentarios y en las demás normas que se expidan para el efecto. El INVIMA podrá autorizar de manera general y previa, toda la publicidad que se ajuste a los criterios generales que para el efecto disponga.

- Identificar, proponer y colaborar con las entidades competentes, en la investigación básica, aplicada y epidemiológica de las áreas de su competencia.
- Realizar actividades permanentes de información y coordinación con los productores y comercializadores, y de educación sanitaria con los consumidores, expendedores y la población en general, sobre cuidados en el manejo y uso de los productos cuya vigilancia le otorga la ley al Instituto.
- Otorgar visto bueno sanitario a la importación y exportación de los productos de su competencia, previo el cumplimiento de los requisitos establecidos en las normas vigentes.
- Propender, dentro de su competencia, por la armonización de las políticas referidas a la vigilancia sanitaria y control de calidad de los productos establecidos en el artículo 245 de la Ley 100 de 1993 y en las demás normas pertinentes, con los países relacionados con Colombia comercialmente.
- Responder y hacer cumplir las normas y reglamentos pertinentes que emanen de la Dirección del Sistema de Seguridad Social en Salud.
- Ejercer las demás funciones que le asigne el Ministerio de la Protección Social o el Gobierno Nacional. (INVIMA, 2008)

2.5.8 ICONTEC: INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACION

Organismo de carácter privado, sin ánimo de lucro, constituido legalmente mediante Resolución 2996 de septiembre de 1963 del Ministerio de Justicia. Está conformado por la vinculación voluntaria de representantes del gobierno nacional, de los sectores privados de la producción, distribución y consumo, el sector tecnológico en sus diferentes ramas y por todas aquellas personas jurídicas que tengan interés en pertenecer. (ICONTEC, 2008)

Actualmente cuenta con más de 1400 afiliados de todos los sectores económicos del país. Estos se han vinculado para fomentar la Normalización, la Certificación, la Metrología y la Gestión de Calidad en Colombia, aspectos que adquieren mayor importancia con la apertura económica, la reconversión industrial y la internacionalización de la economía colombiana.

ICONTEC es miembro de la Organización Internacional de Normalización, ISO, y de la Comisión Electrotécnica Internacional, IEC. En el ámbito latinoamericano, ICONTEC es miembro activo y fundador de la Comisión Panamericana de Normas Técnicas, COPANT.

El Certificado de Gestión de la Calidad otorgado por ICONTEC es reconocido internacionalmente en más de 120 países, y acreditado por una de las entidades más grandes en el ámbito mundial, como es la DAR-TGA, que ha firmado acuerdos multilaterales (MLA) con los miembros acreditadores más representativos en el mundo, para reconocer el trabajo y la aceptación de los certificados que emitan los organismos acreditados en cada país, lo que permite la eliminación de barreras al comercio. Con una sola acreditación, las empresas certificadas por ICONTEC pueden presentar con total confianza su certificado a los clientes de los diferentes países, con la garantía de su aceptación sin ninguna restricción. (ICONTEC, 2008)

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Ante el constante desarrollo del sector alimentario, la presión comercial de los competidores por conseguir análisis más rápidos, coherentes y precisos, junto con el incremento de las normativas de higiene y seguridad, se hace necesario desarrollar productos que suplan las necesidades de los clientes y garanticen calidad reduciendo costos y aumentando la productividad.

Es por ello, que 3M Microbiología como líder competitivo en pruebas microbiológicas pone de manifiesto la necesidad de conocer la competencia local para su producto Placas Petrifilm™.

Por tal razón, esta investigación pretende contribuir al conocimiento de la competencia a nivel técnico, de regulaciones nacionales e internacionales y comercialmente de las Placas Petrifilm 3M™ con el fin de determinar sus fortalezas, debilidades, amenazas oportunidades de mejora y su impacto en el mercado actual.

3.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Realizar un análisis microbiológico suele ser una labor que consume gran cantidad de tiempo y trabajo, de ahí la necesidad de desarrollar y diseñar métodos rápidos y sencillos para cuantificar y detectar microorganismos, ya

que muchas veces es necesario emitir resultados rápidos, que permitan tomar decisiones lo más pronto posible con relación al producto analizado.

En la actualidad las industrias de alimentos se ven en la necesidad de implementar metodologías para el análisis microbiológico que faciliten la obtención de resultados en un tiempo corto, que al mismo tiempo sean fiables, exactos, económicos y ayuden a agilizar los procesos de verificación de lotes de producción para asegurar al consumidor alimentos inocuos que no representen un peligro para la salud.

La importancia de realizar un estudio de tipo comparativo entre las Placas Petrifilm™ elaboradas por 3M y otros productos de recuento de microorganismos presentes en el mercado (Rida Count, medios preparados, medios cromogénicos, métodos convencionales) radica en lograr establecer las ventajas y desventajas competitivas que presenta este producto, además de aprovechar las oportunidades de mejora, logrando de esta manera que las Placas Petrifilm 3M sean el método de recuento rápido de mayor acogida en la industria de alimentos y bebidas.

Para este fin, se realizó un estudio comparativo de los productos presentes en el mercado para el análisis microbiológico rápido a nivel comercial, técnico y de conocimiento de las regulaciones nacionales e internacionales. Lo anterior, implicó pruebas de laboratorio orientadas al análisis de diferentes muestras de alimentos y bebidas, empleando inicialmente la técnica tradicional como punto de referencia para hacer la comparación en términos de sensibilidad, selectividad, resultados y desempeño con los productos de recuento rápido incluyendo Petrifilm. Posteriormente, estas pruebas se encaminaron a establecer la comparación entre las Placas Petrifilm 3M y los productos de la competencia. Por otra parte, el estudio incluyó las regulaciones nacionales e internacionales y certificaciones de calidad que tienen tanto las Placas

Petrifilm™ 3M™ como los productos de la competencia, para determinar su impacto a nivel competitivo y definir los sectores de la industria en los cuales aplican estos productos. Finalmente el estudio comercial, se baso en la aplicación de una encuesta a empresas del sector alimentario, determinación de costos para el análisis microbiológico, investigación de los canales de venta y la evaluación de la presentación final del producto. La encuesta se empleo como un instrumento para la elaboración de una matriz de planificación que permitiera evidenciar las necesidades actuales del cliente.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la competencia en el mercado para 3M Microbiología en técnicas de recuento rápido, mediante un estudio técnico y de normatividad que permita establecer las ventajas y desventajas que ofrece el Petrifilm en el análisis microbiológico.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar los productos de la competencia de 3M en técnicas de recuento de microorganismos indicadores en la industria alimentaría
- Evaluar la eficiencia de las técnicas de recuento rápido con la técnica tradicional para la identificación de microorganismos indicadores en la industria de alimentos.
- Evaluar Petrifilm en términos de productividad y rentabilidad frente a la competencia.
- Determinar el impacto de las regulaciones nacionales e internacionales como ventaja competitiva de la técnica Petrifilm.
- Identificar las necesidades del cliente en técnicas de recuento de microorganismos indicadores en la industria de alimentos
- Determinar el costo total que acarrea el análisis microbiológico de una muestra para cada una de las técnicas en cuestión

5. METODOLOGÍA

Esta investigación se desarrollo en las instalaciones de la Pontificia Universidad Javeriana, Laboratorio de Microbiología de Alimentos, ubicado en la ciudad de Bogotá y fue financiado por 3M Microbiología Colombia.

5.1 Diseño de la investigación

5.1.1 Población de estudio y muestra

Se realizo el análisis de nueve (9) muestras de alimentos (carne de hamburguesa, leche pasteurizada, crema de leche y queso), las cuales se adquirieron en diferentes supermercados del noroccidente de Bogotá. De cada alimento se emplearon tres muestras pertenecientes al mismo lote. Igualmente el análisis incluyo la evaluación de superficies para la detección de *Listeria*. El tamaño de muestra se determino por muestreo no probabilístico.

A las muestras analizadas (leche, crema de leche, queso y hamburguesa) se les realizo el recuento en placa en profundidad de Mesófilos aerobios, Enterobacterias, Coliformes, *Escherichia coli* y Mohos/Levaduras y el recuento en superficie de *Staphylococcus aureus* de acuerdo con las metodologías descritas por las entidades de regulación nacional. Se realizaron controles positivos y negativos en cada uno de los análisis respectivamente.

Para la detección de *Listeria* en superficies, se contaminaron artificialmente (12) doce superficies con un pool que contenía *E. coli*, *Listeria* y *Pseudomonas*, con el fin de determinar la selectividad de la Placa Petrifilm para *Listeria*.

Para la recolección de los datos se elaboró un formato para cada método empleado en donde se consignaron los resultados durante la investigación.

El objetivo experimental del estudio, fue comprobar el desempeño de las placas Petrifilm, Rida count y los medios cromogénicos en comparación con el método tradicional.

Los resultados obtenidos se analizaron aplicando regresión lineal con el \log_{10} de los recuentos; El coeficiente de correlación permitió determinar el grado de concordancia de los datos obtenidos experimentalmente. Se empleo ANOVA para la comparación entre mas de dos grupos y se tuvo en cuenta la diferencia de medias entre los métodos de recuento utilizados.

El programa utilizado para el análisis estadístico fue PAST versión 1.53. (Copyright Hammer and Harper 1999-2006)

Para llevar a cabo el estudio y conocimiento de la competencia presente en el mercado, al igual que las necesidades y preferencias de los consumidores, por una parte se aplicaron 75 encuestas a las personas encargadas de control de calidad de empresas procesadoras de alimentos y laboratorios de servicio, con el fin de desarrollar una matriz de planificación que permitió evidenciar las necesidades de los clientes, identificar oportunidades de mejora y puntos de venta. Por otra parte, se realizó un estudio del mercado para tener conocimiento de los costos, distribuidores, inversión en el mercado y canales de venta de los productos de recuento rápido presentes en el mercado. Finalmente con el fin de evidenciar la incidencia que tiene el contar con algunas aprobaciones y regulaciones nacionales e internacionales, se realizo una revisión detalla de las aprobaciones de cada uno de los productos.

5.2 Métodos

Las metodologías empleadas para realizar el análisis de alimentos en el laboratorio se llevaron a cabo de la siguiente manera:

Se tomaron muestras naturalmente susceptibles a la contaminación por los microorganismos de estudio (leche cruda, queso, crema de leche y hamburguesa). De cada muestra se realizaron tres replicas por cada dilución. Además se realizó un control positivo con las correspondientes cepas (*E. coli*, *S.aureus*, *Salmonella sp* y *Penicillium sp*, *Aspergillus sp*), estas suspensiones de microorganismos se prepararon según el tubo N° 2 del patrón de Mac Farland para bacterias y el N° 3 para hongos y levaduras. También se realizó control negativo de cada uno de los medios empleados.

5.2.1 Dilución y homogenización de las muestras (Holguín et al., 2000)

- La muestra se agitó manualmente antes de iniciar la prueba
- Se verificó la integridad del recipiente o del empaque que contenía las muestras, para abrirlo posteriormente de forma aséptica.
- Se pesaron 10 gr o ml las muestras (Leche, queso, hamburguesa, crema de leche) y se agregaron a frascos con 90 ml agua peptonada al 0.1 %. Posteriormente se agitaron manualmente.
- Se realizaron diluciones seriadas en base 10 (obteniendo así las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4})

5.2.2 Recuento de Mesófilos Aerobios

5.2.2.1 Análisis Microbiológico Tradicional (Holguín et al., 2000)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se transfirió por triplicado, alícuotas de 1 ml de cada una de las diluciones consecutivas en cajas de petri estériles.

- Se vertió en las cajas de petri, 15 – 20 ml de Agar Plate count fundido a una temperatura de 45°C.
- A continuación se mezcló el inóculo con el medio de cultivo fundido.
- Una vez solidificado el medio de cultivo se invirtieron las placas y se incubaron a 35°+/-2°C durante 48 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución y el rango de recuento establecido para estos microorganismos.

5.2.2.2 Placas Petrifilm™ AC (3M, 2004)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se colocó la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada y se levantó la película superior.
- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la película.
- Se dejó caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formaran burbujas.
- Se colocó suavemente el dispersor plástico por el lado de la pestaña hacia abajo sobre la lámina superior, cubriendo el inóculo.
- Se levantó el dispersor y se esperó aproximadamente dos minutos para que se solidifique el gel.
- Se incubaron las placas boca arriba en grupos de máximo 20 placas a 35°+/-2°C durante 48 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia que presentaron color rojizo.
- Se realizó el reporte en unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución utilizado.

5.2.2.3 Rida Count Aeróbios (R- Biopharm, 2006)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se colocó la placa RIDACOUNT en una superficie plana y nivelada.
- Se levantó la película superior
- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la película.
- Se dejó absorber la muestra sobre la lamina y luego se dejó caer la cubierta superior sobre el inóculo, cuidando no dejar burbujas de aire por el borde la placa.
- Se incubaron las placas boca arriba en grupos de 20 placas a 35°C durante 24-48 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia (tonalidad roja) por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución y el rango de recuento establecido para estos microorganismos.

5.2.3 Recuento de Enterobacterias

5.2.3.1 Análisis Microbiológico Tradicional (Holguín et al., 2000)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se transfirió por triplicado, alícuotas de 1 ml de cada una de las diluciones consecutivas en cajas de petri estériles.
- Se vertió en las cajas de petri, 15 – 20 ml de Agar Mac Conkey fundido a una temperatura de 45°C.
- Posteriormente se mezcló el inóculo con el medio de cultivo fundido.
- Una vez solidificado el medio de cultivo se invirtieron las placas y se incubaron a 35°±2°C durante 48 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución y el rango de recuento establecido para estos microorganismos.

5.2.3.2 Placas Petrifilm™ Enterobacterias (3M, 2004)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se colocó la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada y se levantó la película superior.
- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la película.
- Se dejó caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formaran burbujas.
- Se colocó suavemente el dispersor plástico por el lado liso sobre la lámina superior, cubriendo el inóculo.
- Se levantó el dispersor y se esperó aproximadamente dos minutos para que se solidifique el gel.
- Se incubaron las placas boca arriba en grupos de máximo 20 placas a $35^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia que presentaron color rojas con gas (burbuja), Rojas con Zona amarilla, rojas con zona amarilla y presencia de gas.
- Se realizó el reporte en unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución y el rango de recuento establecido para estos microorganismos.

5.2.3.3 Rida Count Enterobacterias (R- Biopharm, 2006)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se colocó la placa RIDACOUNT en una superficie plana y nivelada.
- Se levantó la película superior
- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la película.

- Se dejó absorber la muestra sobre la lamina y luego se dejó caer la cubierta superior sobre el inóculo, cuidando no dejar burbujas de aire por el borde de la placa.
- Se incubaron las placas boca arriba en grupos de por lo menos 20 placas a 35°C durante 24 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia (tonalidad azul) por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución

5.2.4 Recuento de Coliformes

5.2.4.1 Análisis Microbiológico Tradicional (Holguín et al., 2000)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se transfirió por triplicado, alícuotas de 1 ml de cada una de las diluciones consecutivas en cajas de petri estériles.
- Se vertió en las cajas de petri, 15 – 20 ml de Agar VRB fundido a una temperatura de 45°C.
- Posteriormente se mezcló el inóculo con el medio de cultivo fundido.
- Una vez solidificado el medio de cultivo se invirtieron las placas y se incubaron a 35°±2°C durante 48 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución y el rango de recuento establecido para estos microorganismos.

5.2.4.2 NMP de Coliformes Totales (NTC 4092)

Prueba presuntiva:

- Se pipeteó 1 ml de cada una de las diluciones de homogenizado del alimento en tubos con caldo lactosado bilis verde brillante 2%, utilizando tres tubos por cada dilución.
- Se agitó suavemente los tubos y se incubaron a 35°C +/-2°C por 24-48 horas. Verificar la no presencia de aire en las campanas
- Pasadas las 48 horas, se anotaron los tubos que mostraron turbidez y producción de gas, que se observó por el desplazamiento del medio en el tubo de Durham. Si a las 24 horas todos los tubos mostraron turbidez y producción de gas, se continuó con la prueba confirmativa.

Prueba confirmativa:

- Para la confirmación de la presencia de coliformes en los tubos que presentaron turbidez y producción de gas en el caldo lactosado bilis verde brillante al 2% de la prueba presuntiva, se sembró por estrías una asada de cada uno de los tubos en la superficie de una placa de Agar eosina azul de metileno (EMB).
- Se incubaron las placas invertidas a 35°C +/-2°C por 24 horas
- Se realizó la lectura de las colonias típicas de coliformes. (Fermentación de lactosa)
- Se anotó el número de tubos confirmados como positivos para organismos coliformes en cada dilución.

Expresión de resultados:

Para obtener el NMP, se procedió de la siguiente manera:

Se anotó el número de tubos positivos de cada una de las tres diluciones seleccionadas, verificando con el agar EMB, solo se consideran coliformes los

tubos que hallan presentado la característica de fermentar lactosa en el agar EMB.

Se buscó en la tabla del NMP y se informo como NMP de Coliformes/ g o mL de alimento analizado

5.2.4.3 Placas Petrifilm™ Coliformes (3M., 2004)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se colocó la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada y se levantó la película superior.
- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la película.
- Se dejo caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formaran burbujas.
- Se colocó suavemente el dispersor plástico por el lado liso sobre la lámina superior, cubriendo el inóculo.
- Se levantó el dispersor y se esperó aproximadamente dos minutos para que se solidifique el gel.
- Se incubaron las placas boca arriba en grupos de máximo 20 placas a $35^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia que presentaron color rojo con presencia de gas.
- Se realizo el reporte en unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro. teniendo en cuenta el factor de dilución.

5.2.4.4 Rida Count Coliformes (R- Biopharm, 2006)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se colocó la placa RIDACOUNT en una superficie plana y nivelada.
- Se levantó la película superior

- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la película.
- Se dejó absorber la muestra sobre la lamina y luego se dejó caer la cubierta superior sobre el inóculo, cuidando no dejar burbujas de aire por el borde la placa.
- Se incubaron las placas boca arriba en grupos de por lo menos 20 placas a 35°C durante 24 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia (tonalidad azul) por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución

5.2.5 Recuento de *Escherichia coli*

5.2.5.1 Análisis Microbiológico Tradicional: Ausencia/ Presencia de *Escherichia coli*

- Se pesó 25 gramos de muestra y se colocó en 225 ml de caldo tripticosa soya, el cual se incubó durante 6-8 horas a 35°C
- Se tomó 1 ml de la muestra anterior y se transfirió a un tubo que contenía 10 ml de caldo EC. Este se incubó a 35°C durante 18 horas.
- Se realizó un aislamiento por agotamiento en cajas con agar EMB y Mac Conkey y se incubó a 35°C durante 24-48 horas
- Después del proceso de incubación se observaron las colonias características (lactosa positiva) y se realizaron las pruebas bioquímicas: Citrato, Indol, Rojo de metilo y Vorges Proskauer. Se incubó a 35°C durante 18 horas.
- Se revelaron las bioquímicas con los reactivos correspondientes.

5.2.5.2 Análisis Microbiológico para *E. coli* empleando medios cromogénicos: Chromocult – TBX

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se transfirió por triplicado, alícuotas de 1 ml de cada una de las diluciones consecutivas en cajas de petri estériles.
- Se vertió en las cajas de petri, 15 – 20 ml de Agar Chromocult/TBX fundido a una temperatura de 45°C.
- Posteriormente se mezcló el inóculo con el medio de cultivo fundido.
- Una vez solidificado el medio de cultivo se invirtieron las placas y se incubaron a 35°±2°C durante 24 a 48 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución y el rango de recuento establecido para estos microorganismos.

5.2.5.3 Placas Petrifilm™ *E. coli*/ Coliformes (3M,2004)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se colocó la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada y se levantó la película superior.
- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la película.
- Se dejó caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formaran burbujas.
- Se colocó suavemente el dispersor plástico por el lado liso sobre la lámina superior, cubriendo el inóculo.
- Se levantó el dispersor y se esperó aproximadamente dos minutos para que se solidifique el gel.
- Se incubaron las placas boca arriba en grupos de máximo 20 placas a 35°±2°C durante 24 horas.

- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia que presentaron color azul con presencia de gas.
- Se realizó el reporte en unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución.

5.2.5.4. Rida count *E. coli*/ Coliformes (R-Biopharm, 2006)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se colocó la placa RIDACOUNT en una superficie plana y nivelada.
- Se levanto la película superior
- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la película.
- Se dejó absorber la muestra sobre la lamina y luego se dejó caer la cubierta superior sobre el inóculo, cuidando no dejar burbujas de aire por el borde la placa.
- Se incubaron las placas boca arriba en grupos de por lo menos 20 placas a 35°C durante 24 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia (tonalidad purpura) por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución.

5.2.5.5 Coli ID

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se dejó atemperar el frasco. Se aflojó la tapa del frasco de agar. Se colocó el frasco de agar en un baño maría a aproximadamente 50°C.
- Se aumentó la temperatura a 95°C hasta que se fundiera el agar (aproximadamente 45 minutos). Se cerró el frasco y se homogenizó.
- Se dejó el frasco a temperatura ambiente durante al menos 15 segundos antes de transferirlos a un baño de agua termostatizada a 47°C.

- Se adicionó aproximadamente 15 ml de medio coli ID fundido sobre cajas de petri estériles, previamente inoculadas con la muestra.
- Se homogenizó y se llevaron a incubar las placas a 44°C durante 24 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia (color azul) por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución y el rango de recuento establecido para estos microorganismos.

5.2.6 Recuento de *Staphylococcus aureus*

5.2.6.1 Análisis Microbiológico Tradicional (Holguín et al., 2000)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados
- Se transfirió por triplicado, alícuotas de 0.1 ml de cada dilución y se agregó en la superficie de agar Baird Parker.
- Se extendió la muestra con una espátula de vidrio estéril sobre el agar.
- Se taparon las cajas y se dejó absorber la muestra durante unos 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se invirtieron las cajas y se llevaron a incubar a 37+/-2°C durante 18-24 horas.
- Después de 24 horas de incubación, se marcaron en la placa las colonias características (de 1 a 1.5 mm de diámetro, negras o grises y convexas, rodeadas de una zona clara)
- Posteriormente se incubaron durante 24+/-2°C más.
- Se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia por gramo o mililitro de la muestra.
- Se seleccionó colonias representativas de la placa y se sembró en un tubo con caldo BHI y se llevo a incubar a 35°C durante 12-24 horas.
- Se tomó 0.1 ml de este cultivo, se adicionó a 0.3 ml de plasma de conejo y se incubó a 35°C.

- Se evidenció la coagulación del plasma al cabo de ½ y 1 hora.

5.2.6.2 Placa Petrifilm™ Staph Express (3M, 2004)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se colocó la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada y se levantó la película superior.
- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la película.
- Se dejó caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formaran burbujas.
- Se colocó suavemente el dispersor plástico correspondiente sobre la lámina superior, cubriendo el inóculo.
- Se levantó el dispersor y se esperó aproximadamente dos minutos para que se solidifique el gel.
- Se incubaron las placas boca arriba en grupos de máximo 20 placas a 35°±2°C durante 24 horas.
- Posteriormente se observó la aparición de colonias de color rojo-violeta, en caso de que se presentaran colonias de otra tonalidad, se insertó el disco de confirmación por DNAsa Staph Express.
- Se incubaron nuevamente las placas a 35°C durante 1-3 horas
- Se realizó el recuento de colonias que presentaran zonas rosadas como pertenecientes a *S. aureus*
- Se realizó el reporte en unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro. Teniendo en cuenta el factor de dilución.

5.2.6.3 Rida Count Staphylococcus aureus (R-Biopharm,2006)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se colocó la placa RIDACOUNT en una superficie plana y nivelada, se levantó la película superior.

- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la película.
- Se dejó absorber la muestra sobre la lámina y luego se dejó caer la cubierta superior sobre el inóculo, cuidando no dejar burbujas de aire por el borde la placa.
- Se incubaron las placas a $35^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de las colonias características de color verde azulado, en cada una de las placas.
- Se realizó el reporte en unidades formadoras de colonia por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución.

5.2.6.4 Análisis Microbiológico empleando Agar Baird Parker - bioMérieux

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se colocaron las placas de agar Baird Parker sobre una superficie plana y nivelada.
- Con la pipeta, se colocó por triplicado 0.1 ml de cada una de las diluciones y se homogenizó con bastones de vidrio.
- Se incubaron las placas invertidas a 35°C durante 24-48 horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia (negras) por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución.

5.2.7 Recuento de Hongos y Levaduras

5.2.71. Análisis Microbiológico Tradicional (Holguín et al., 2000)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se transfirió por triplicado, alícuotas de 1 ml de cada una de las diluciones consecutivas en cajas de petri estériles.
- Se vertió en las cajas de petri, 15 – 20 ml de Agar Saboreaud fundido a una temperatura de 45°C .
- Posteriormente se mezcló el inóculo con el medio de cultivo fundido.

- Una vez solidificado el medio de cultivo se invirtieron las placas y se incubaron a $22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5-7 días.
- Posteriormente se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia por gramo o mililitro, y se realizó el informe.

5.2.7.2 Placa Petrifilm™ Mohos y Levaduras (3M, 2004)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se colocó la Placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada y se levantó la película superior.
- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la película.
- Se dejó caer la película superior sobre la muestra, cuidando que no se formaran burbujas.
- Se colocó suavemente el dispersor plástico correspondiente sobre la lámina superior, cubriendo el inóculo.
- Se levantó el dispersor y se esperó aproximadamente dos minutos para que se solidifique el gel.
- Se incubaron las placas boca arriba en grupos de máximo 20 placas a $22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3-5 días.
- Posteriormente se realizó el recuento de hongos quienes se observan como colonias grandes, difusas y de color variable, mientras que las levaduras forman colonias pequeñas con borde definido y de color azul-verdoso.
- Se realizó el reporte en unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución.

5.2.7.3 Rida Count Mohos y Levaduras (R- Biopharm, 2006)

- Se preparó la muestra y las diluciones de los homogenizados.
- Se colocó la placa RIDACOUNT en una superficie plana y nivelada, se levantó la película superior.

- Con la pipeta perpendicular a la placa, se colocó por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones en el centro de la película.
- Se dejó absorber la muestra sobre la lamina y luego se dejó caer la cubierta superior sobre el inóculo, cuidando no dejar burbujas de aire por el borde la placa.
- Se incubaron las placas a 25°+/-2°C durante BBB horas.
- Posteriormente se realizó el recuento de las colonias características de color verde azulado, en cada una de las placas.
- Se realizó el reporte en unidades formadoras de colonia por gramo o mililitro, teniendo en cuenta el factor de dilución utilizado.

Para realizar el recuento de unidades formadoras de colonia de cada análisis se tuvieron en cuenta los rangos establecidos de conteo.

TABLA 4. Rangos (UFC) de conteo utilizados para el recuento de colonias.

| MICROORGANISMOS | RANGO (UFC) |
|--------------------|-------------|
| Mesófilos | 30-300 |
| Enterobacterias | 20-200 |
| Coliformes | 20-200 |
| Hongos y levaduras | 15-150 |
| <i>E. coli</i> | 20-200 |
| <i>S. aureus</i> | 20-200 |

5.2.8 Placas Petrifilm™ Recuento de Listeria en Ambientes (3M.,2006)

- Se reconstituyó la cepa de *Listeria monocytogenes* en caldo BHI.
- Se realizó un pool con *E. coli*, *Pseudomonas sp*, *Listeria monocytogenes* en un frasco shott que contenía 20ml de caldo BHI.
- Se incubó durante 24 horas a 35°C en agitación.
- Se emplearon tabletas de baldosín estériles.
- Se contaminaron las superficies con el pool de bacterias y se dejó secar.
- Se tomó la muestra de la superficie utilizando un hisopo previamente humedecido en agua bufferada y caldo letheen.

- Se depositó el hisopo dentro del tubo y se llevó a incubar durante 1 hora a 37°C.
- Posteriormente colocó la placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada.
- Se levantó la película superior y con una pipeta perpendicular a la placa se colocó 3 ml de la muestra en el centro de la película inferior.
- Se deslizó la película superior sobre la muestra, se colocó suavemente el dispersor plástico en la lamina superior sobre el inóculo
- Se incubaron las placas cara arriba durante 28 horas a 37°C.
- Se observó la aparición de colonias color rojo - violeta.

5.2.9 Informe de los resultados (NTC 4092, 1997)

Se realizó el reporte de los resultados de los recuentos según lo estipulado en la NTC 4092 de 1997.

$$N = \frac{\Sigma C}{V [(n_1 + 0.1 * n_2) * d]}$$

Donde:

ΣC: Es la sumatoria de las colonias contadas en todas las cajas de petri que contienen dos diluciones sucesivas.

V: Es el valor del inóculo aplicado a cada caja, en mililitros.

n₁: Es el número de cajas retenidas en la primera dilución.

n₂: Es el número de cajas retenidas en la segunda dilución.

d: Es el factor de dilución correspondiente a la primera dilución retenida.

Una vez obtenido el recuento, se hizo su equivalencia redondeando el resultado para obtener dos cifras significativas. Para esto, si la última cifra era inferior a 5 no se modificó la cifra, si la última cifra era igual o mayor a 5, la cifra anterior se aumentó en una unidad, y se reportó el resultado en forma exponencial.

5.2.10 Análisis de mercado

5.2.10.1 Análisis de Costos

Se realizó un estudio detallado de los costos que demanda el análisis de una muestra, para ello se empleó una matriz de costos, la cual contempló, costos de mano de obra e insumos. Se investigaron los precios de cada uno de los productos necesarios para realizar el análisis y se trabajó la mano de obra con base a un salario de \$ 1.500.000. Finalmente se determinó el costo total que acarrea el montaje de cada una de las técnicas en cuestión.

5.2.10.2 Matriz de Planificación: Casa de la Calidad

Se diseñó una encuesta de 9 preguntas (Anexo 1). Esta encuesta se aplicó a un total de 75 personas que se desempeñan en diferentes empresas del sector de alimentos. A partir de la encuesta se determinaron principalmente las necesidades del cliente en técnicas de recuento rápido, puntos de venta, metas, situación actual del mercado y se estableció una comparación entre las tres técnicas estudiadas. El criterio de selección para aplicar las encuestas a ciertas empresas fue basado principalmente en su sector de desempeño y reconocimiento.

- Se identificaron los atributos del cliente, es decir los requisitos del producto, a través de una encuesta directa de los clientes para saber sus necesidades, satisfacción y razones para la compra de un producto determinado.
- Se realizó una lista de las características del producto y estableció la interrelación entre estas características, se emplearon símbolos para indicar el grado de relación.
- Se desarrolló una matriz de relación entre los atributos del cliente y las características equivalentes del producto, de la misma manera que en el punto dos se emplearon símbolos para indicar el grado de relación.
- Se le dio una calificación de importancia (1-5) a cada atributo del cliente y se evaluaron los productos actuales respecto a cada uno de los atributos.
- Se evaluaron las características equivalentes del producto en los productos de la competencia y se establecieron a partir de esta evaluación las metas.
- Se seleccionaron las características equivalente que presenta una fuerte relación con las necesidades del cliente, que además tengan mala funcionalidad frente a la competencia o que sean fuertes argumentos de venta.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aprobaciones Regulatorias

Se realizó una evaluación detallada de los productos y métodos vigentes en el mercado para el análisis microbiológico de alimentos, se determinó para cada producto el tipo de aprobaciones con las que cuenta y la importancia que representa en el mercado contar con dichas certificaciones.

6.1.1 Placas Petrifilm™

La empresa 3M ofrece productos que cumplen con los requerimientos mas exigentes de las organizaciones de referencia, agencias regulatorias de aprobación y corporaciones multinacionales, de tal manera que se tenga plena confianza en los métodos de pruebas. Las placas Petrifilm son manufacturadas por 3M en instalaciones certificadas con ISO 9002, adicionalmente en la actualidad estas placas cuentan con mas de 200 aprobaciones y publicaciones científicas. La Asociación Francesa de Normalización ha validado las Placas Petrifilm para el recuento de aerobios totales, recuento de *E. coli*/coliformes, recuento de Enterobacterias, recuento de alta sensibilidad de coliformes y recuento de *Staphylococcus aureus* en todo tipo de alimentos, como también la placa para el recuento de coliformes y recuento rápido de coliformes en alimentos exceptuando mariscos crudos y productos procesados de cerdo respectivamente. Este sistema de validación riguroso, garantiza que los resultados obtenidos con este método comercial sean equivalentes a los resultados obtenidos con métodos normalizados y adicionalmente asegura un reconocimiento europeo.

La Asociación Americana de Salud Pública (APHA) de los Estados Unidos ha validado las placas como métodos estandarizados para la exanimación de productos lácteos. Por otro lado, la Placa Petrifilm para recuento de *E.coli* / Coliformes cumple con los requerimientos definidos por USDA en pruebas para la reducción de patógenos (HACCP).

Por su parte, la Asociación Científica AOAC ha validado las placas petrifilm de acuerdo con su programa de métodos oficiales como se nombra a continuación:

Placas aerobios totales para el análisis de leche cruda y pasteurizada, productos lácteos y alimentos.

Placas recuento de Coliformes para el análisis de leche cruda y pasteurizada, productos lácteos y alimentos.

Placas Alta Sensibilidad Recuento Coliformes para el análisis de productos lácteos.

Placas Recuento *E. coli* / Coliformes para el análisis de alimentos, aves, carne y mariscos.

Placas Recuento Hongos y Levaduras para el análisis de todo tipo de alimentos.

Placas Recuento Rápido *S. aureus* para el análisis de alimentos procesados selectos, alimentos lácteos selectos, carnes, alimentos marinos y aves.

La aprobación dada por la AOAC es una validación multi-laboratorios, lo cual proporciona un alto grado de confianza en el desempeño de este método comercial, proporcionando resultados creíbles, defendibles y reproducibles. Al

contar con la aprobación **AOAC-OMA** los métodos son aceptados y reconocidos por agencias regulatorias y organizacionales de todo el mundo.

En el escenario nacional las placas Petrifilm cuentan con el reconocimiento del ICONTEC, como un método horizontal de análisis microbiológico para bebidas y alimentos, según se señala en la Guía Técnica Colombiana, GTC 125 / 2005 y que se nombran a continuación: Métodos horizontales para hongos y levaduras en todos los alimentos, Método horizontal para aerobios para productos lácteos y otros alimentos, Métodos horizontales para coliformes en productos lácteos, y demás alimentos. De igual forma, las Placas Petrifilm™ a nivel nacional tiene los siguientes reconocimientos: Carta INVIMA, Carta individual de reconocimiento de aplicaciones para cada una de las placas, Documento Puertos Invima, Resolución 00414 del 2002 del Ministerio de Salud, para aguas.

Adicional a las aprobaciones otorgadas por las organizaciones mencionadas anteriormente, las placas Petrifilm cuentan con un gran número de aprobaciones dadas por diferentes países entre ellos: Australia, Canadá, Chile, Alemania; Japón, Korea, Nueva Zelanda, Países Nórdicos, Polonia, Sur África, Reino Unido y Venezuela entre otros, lo cual hace de las Placas Petrifilm un método comercial para el recuento rápido de microorganismos reconocido a nivel mundial para el análisis de muestras de alimentos; Este respaldo hace que los resultados obtenidos bajo esta técnica sean confiables y generen mayor credibilidad al usuario final, al utilizar esta técnica como método de obtención de resultados. (Tabla 5)

**TABLA 5. APROBACIONES Y RECONOCIMIENTOS DE LAS PLACAS
PETRFILM DE 3M**

| AFNOR- FRANCIA | | |
|--|--|--|
| AFNOR-Francia | | |
| Todos los alimentos: | Placas de Recuento Aeróbica | AFNOR Número de Certificado3M 01/1-09/89 |
| Todos los alimentos (excepto mariscos crudos): | Placas de Recuento Coliformes Resultados en 24 horas de Coliformes totales (comparado con el método VRBL) | AFNOR Número de Certificado3M 01/2-09/89 ^a |
| Todos los alimentos (excepto mariscos crudos) | Placas de Recuento Coliformes Resultados en 24 horas de Coliformes totales (comparado con el método de NMP) | AFNOR Número de Certificado3M 01/2-09/89B |
| Todos los alimentos: | Placas de Recuento Coliformes Resultados en 24 horas de Coliformes termotolerantes (comparado con el método VRBL 44.5°C) | AFNOR Número de Certificado3M 01/2-09/89C |
| Todos los alimentos: | Placas de Recuento <i>E. coli</i> /Coliformes Recuento <i>E. coli</i> | AFNOR Número de Certificado3M 01/4-09/92 |
| Todos los alimentos: | Placas Recuento <i>E. coli</i> Recuento <i>E. coli</i> | AFNOR Número de Certificado3M 01/8-06/01 |
| Todos los alimentos: | Placas Recuento Rápida Coliformes Resultados en 14 horas (comparado con el método VRBL 30 °C) | AFNOR Números de Certificados3M 01/5-03/97A(Incubar a 30°C para productos procesados de cerdo) |
| Todos los alimentos: | Placas Recuento Rápida Coliformes Resultados en 24 horas (comparado con el método VRBL 30 °C) | AFNOR Número de Certificado3M 01/5-03/97B(Incubar a 30°C para productos procesados de cerdo) |
| Todos los alimentos : (excepto productos procesados de cerdo) | Placas de Recuento Rápida Coliformes Resultados en 24 horas (comparado con método NMP) | AFNOR Número de Certificado3M 01/5-03/97C |
| Todos los alimentos: | Placas Recuento <i>Enterobacteriaceae</i> | AFNOR Número de Certificado3M 01/6-09/97 |
| Todos los alimentos: | Placas de Alta Sensibilidad para Recuento de Coliformes(comparado con método NMP) | AFNOR Número de Certificado3M 01/7-03/99 |
| Todos los alimentos: | Sistema de Recuento Staph Express | AFNOR Número de Certificado3M 01/9-04/03 |

| Asociación Americana de Salud Pública - Estados Unidos | | |
|---|--|-------------------|
| Métodos Estandarizados para la Exanimación de Productos Lácteos | | |
| AOAC® Métodos Oficiales de Análisis | | |
| Leche cruda y pasteurizada: | Placas Recuento Aeróbicos, Placas Recuento Coliformes | Método 986.33 |
| Productos lácteos: | Placas Recuento Aeróbicos, Placas Recuento Coliformes | Método 989.10 |
| Alimentos: | Placas Alta Sensibilidad Recuento Coliformes | Método 996.02 |
| | Placas Recuento Aeróbicos | Método 990.12 |
| | Recuento Coliformes, Placas Recuento <i>E. coli</i> / Coliformes | Método 991.14 |
| | Placas Recuento Levaduras y Hongos | Método 997.02 |
| Aves, carne, mariscos: | Placas Recuento <i>E. coli</i> / Coliformes | Método 998.08 |
| Alimentos selectos | Placas Recuento Rápido <i>S. aureus</i> | Método 2001.05 |
| Alimentos selectos | Placas Recuento <i>Enterobacteriaceae</i> | Método 2003.01 |
| Tipos Selectos de Carne, Alimentos marinos y Aves | Placas Recuento Staph Express | Método 2003.11 |
| Tipos Selectos de Alimentos Procesados y Preparados | Placas Recuento Staph Express | Método 2003.07 |
| Alimentos Lácteos Selectos | Placas Recuento Staph Express | Método 2003.08 |
| Departamento de Agricultura - Bélgica | | |
| Leche: | Placas Recuento Aerobias | |
| Unión Finlandesa de Estándares (Comité de Suministros) - Finlandia | | |
| Leche: | Placas Recuento Aerobias | |
| | Placas Recuento Coliformes | |
| Leche Pasteurizada Grado A - Estados Unidos | | |
| Leche cruda, leche pasteurizada y productos lácteos: | Placas Recuento Aerobias, Recuento Coliformes, Recuento Alta Sensibilidad Coliformes | |
| Aceptabilidad de leche cruda con técnica de asa en placa: | Placas Recuento Aerobias | |
| Sector Protección Salud, Compendio de Métodos Analíticos- Canadá | | |
| Procedimientos Laboratorio: | | |
| Muestreo Ambiental: | Placas Recuento Aerobias | Método MFLP - 41A |
| | Placas Recuento Coliformes, Recuento <i>E. coli</i> / Coliformes | |

| | | |
|---|---|-------------------------------|
| | Placas Recuento Levaduras y Hongos | |
| Productos Lácteos: | Placas Alta Sensibilidad Recuento Coliformes | Método MFLP - 41B |
| | Placas Alta Sensibilidad Recuento Coliformes | Método MFLP - 85 |
| Métodos Sector Protección Salud: | | |
| Productos alimenticios e ingredientes: | Placas Recuento Aerobios | Método MFHPB - 33 |
| | Placas Recuento Coliformes | Método MFHPB - 35 |
| | Placas <i>E. coli</i> / Coliformes | Método MFHPB - 34 |
| | Placas Recuento Levaduras y Hongos | Método MFHPB - 32 |
| Ministerio de Agricultura - Rumania | | |
| Todos los alimentos: | Recuento Aerobios, Recuento Coliformes | |
| | Recuento <i>E. coli</i> / Coliformes | |
| | Recuento Levaduras y Hongos | Registro No. 116443 |
| | Placas Alta Sensibilidad Recuento Coliformes | |
| Ministerio de Salud - República Checa | | |
| Todos los alimentos: | Recuento Aerobios, Recuento Coliformes | |
| | Recuento <i>E. coli</i> / Coliformes | |
| | Recuento Levaduras y Hongos | |
| | Placas Alta Sensibilidad Recuento Coliformes | Registro No. HEM-3806-24.5.95 |
| Ministerio de Salud - Japón | | |
| Hisopo para cadáveres (ganado y cerdo) | Placas Recuento <i>E. coli</i> / Coliformes | Notificación No. 25 |
| Manual Pruebas Lácteas Sur Nueva Gales - Australia | | |
| Alternativa Oficial al Recuento Estándar en Placa y Pruebas de Recuento Coliformes | | |
| Comité Nórdico para Análisis de Alimentos (NMKL) | | |
| Todos los alimentos: | Placas Recuento Aerobios | Método NMKL 146.1993 |
| | Placas Recuento Coliformes, Placas Recuento <i>E. coli</i> / Coliformes | Método NMKL 147.1993 |
| Comisión Venezolana de Estándares Industriales | | |
| Productos Lácteos y otros alimentos: | Placas Recuento Aerobios | Covenin 3338:1997 |
| | Placas Recuento <i>E. coli</i> / Coliformes | Covenin 3276:1997 |
| Productos Lácteos: | Placas Alta Sensibilidad Recuento Coliformes | Covenin 3339:1997 |
| Autoridad Victoriana Industria Láctea (VDIA) - Australia | | |
| Leche y productos lácteos: | Placas Recuento Aerobios | Número de Certificado 9503 |
| | Placas Recuento Coliformes | Número de Certificado 9504 |

6.1.2 Placas Rida Count – Sanita Kun

Las placas RIDA[®]COUNT ó SANITA KUN son un producto comercial elaborado en el Japón por la Corporación Chisso; actualmente se han venido posicionando en el mercado convirtiéndose en una competencia fuerte para los demás productos comerciales presentes en el mercado, sin embargo no cuentan con una antigüedad representativa para el recuento de microorganismos, lo cual se convierte una desventaja competitiva. A nivel de aprobaciones y reconocimientos, la placa RIDA[®]COUNT Total es conocida como un método validado de desempeño AOAC (Certificado No. 011001), así mismo el test de Coliformes RIDA[®]COUNT también ha recibido el estatus de método probado de desempeño (Certificado No. 100402). Esta aprobación **AOAC-RI**, es un programa que se aplica cuando se necesita de una validación rápida y con cierto grado de confianza, esta validación es otorgada por un solo laboratorio, sin embargo, da cierto reconocimiento internacional con sus debidas restricciones. Las demás placas no mencionadas no cuentan con ningún tipo de validación hasta ahora conocido. La placa Rida count de aerobios totales fue validada para una gran variedad de alimentos como: cerdo congelado o asado, carne molida, perros calientes, camarones crudos o congelados, helado, huevos con cáscara o huevos fritos, orégano, harina de alforfón, pasas, fideos, mantequilla de maní, chocolate, alimentos deshidratados para gatos y pizza congelada.

TABLA 6. APROBACIONES RIDA[®]COUNT

| AOAC[®] Método probado en su desempeño | | |
|--|-----------------------|------------------------|
| Variedad de alimentos | Rida count Total | Certificado No. 011001 |
| Variedad de alimentos | Rida count Coliformes | Certificado No. 100402 |

6.1.3 Medio Coli ID (COLI ID-F)

El medio coli ID es un medio cromogénico diseñado y comercializado por la Multinacional Francesa bioMerieux, ha sido aprobado por AFNOR para su incubación a 44°C según el método estandarizado NF ISO 16649-2 para el recuento de *E. coli* β D-glucuronidasa positivo. Igualmente a sido aprobado para su incubación a 37°C según el método estandarizado NF ISO 4832 para el recuento de coliformes mediante las técnica del conteo de colonias, así para el método estandarizado NF ISO 16649-2 para el recuento de *E. coli* β D-glucuronidasa positivo. Esta validación se realizo según la norma ISO 16410.

El medio Coli ID ha sido sido aprobado comparando con el estándar para el recuento de *E. coli* β D-glucuronidasa positivo en todos los productos de alimentación humana. La aprobación de la Asociación Francesa de Normalización da un reconocimiento en Europa y garantiza resultados equivalentes a los que se obtienen con los métodos normalizados.

TABLA 7. APROBACIONES COLI ID

| AFNOR-Francia | |
|--|----------------|
| Método horizontal para la detección de <i>E. coli</i> β D-glucuronidasa positivo en alimentos para humanos y animales. (Recuento de colonias a 44°C) | NF ISO 16649-2 |
| Recuento de coliformes: técnica de conteo de colonias. (incubación a 37°C) | NF ISO 4832 |

6.1.4 Medios de Cultivo (Scharlau)

Los medios de cultivo deshidratados actualmente están siendo fabricados y comercializados por diferentes casas comerciales de gran reconocimiento, sin embargo, para este estudio se trabajó con los medios de cultivo elaborados por la Industria Scharlau, una empresa que centra su actividad en la producción y comercialización de productos y servicios específicos para los laboratorios químicos y microbiológicos. Esta empresa fabrica sus medios siguiendo los cánones de calidad que establece en su propio sistema de gestión de la calidad de acuerdo con la ISO 9001:2000 y también siguiendo los requerimientos que exigen los medios de cultivo que se usan en los diversos métodos validados, estándares y guías microbiológicas (ISO, AFNOR, European Pharmacopoeia, USP, FDA, etc.).

6.1.5 Medio de Cultivo Cromogénico: Chromocult *E. coli*/Coliformes

El medio de cultivo cromogénico Chromocult es elaborado por la casa comercial Merck, la cual está conformada por un grupo de empresas que operan a nivel mundial, especializadas en productos farmacéuticos y químicos y en la distribución a laboratorios. Los productos Merck son elaborados en una planta de producción farmacéutica BPM en Colombia aprobada por el INVIMA, la cual surte productos de excelente calidad a toda Latinoamérica e incluso fabrica para otras prestigiosas compañías de la región.

Desde el año 1885 Merck es líder en investigación y desarrollo de medios de cultivo y otros productos microbiológicos relacionados para el análisis de alimentos, bebidas, aguas, biotecnología y medio ambiente. Modernos desarrollos incluyen la adición de sustratos fluorogénicos y cromogénicos dando lugar a la línea de productos Fluorocult y Chromocult, los cuales permiten simplificar la interpretación de los resultados.

Merck es reconocida como la primera empresa química - farmacéutica en alcanzar la certificación ISO 9001-2000 en Colombia y ha recibido importantes reconocimientos por su compromiso con la protección del medio ambiente.

El agar Chromocult ha sido aprobado bajo las normas de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos US-EPA y esta en proceso su aprobación AOAC.

6.1.6 Medio Baird Parker (bioMérieux)

TABLA 8. APROBACIONES bioMerieux

| AFNOR-Francia | |
|--|------------------------|
| Microbiología de alimentos - Guía para la preparación y producción de medios de cultivo. | XP CEN ISO /TS 11133-2 |

6.2 Análisis de costos

El costo total de las técnicas Petrifilm, Ridacount y tradicional para cada análisis se registra en la Tabla 9. La matriz de costos permitió evidenciar los gastos que lleva el montaje del análisis de una muestra determinada. Estos costos demuestran que la técnica tradicional constituye a simple vista, la opción más económica presente en el mercado en lo que se refiere a insumos y reactivos, sin embargo a su vez demanda altos costos en lo que se refiere a mano de obra, espacios y tiempo de análisis. Mientras que Petrifilm y Ridacount proporcionan un ahorro en cuanto a mano de obra, ya que se omiten los pasos de preparación de

medios, esterilización, pesaje, etc, lo cual de acuerdo con las necesidades actuales del mercado representa un enorme beneficio para la obtención rápida de resultados. Adicionalmente, estas técnicas generalmente evitan pasos de confirmación por la presencia de sustancias cromógenas específicas para los microorganismos de interés.

Los medios cromogenicos Chromocult y Coli ID se presentan como una alternativa más costosa para realizar un análisis tradicional, pero presentan la ventaja de evitar pasos de confirmación gracias a la presencia de sustratos cromógenos específicos para el microorganismo de interés, además de reducir el tiempo de incubación, lo cual permite obtener resultados en corto tiempo. No permiten tener un ahorro significativo en mano de obra, ya que por un parte el Chromocult es un medio deshidratado que necesita reconstituirse pero que no requiere de esterilización en autoclave; El coli ID, de la misma manera reduce los pasos de pesaje y autoclavado, sin embargo, demanda un tiempo considerable para su reconstitución total. Estos medios representan una alternativa más económica que las Placas Petrifilm y Ridacount.

Ya que la mano de obra, constituye el componente más caro que demanda el análisis microbiológico de una muestra determinada, el empleo de algunas alternativas en técnicas de recuento rápido se convierte en una ayuda para incrementar la productividad y la eficiencia de sus operaciones. De esta manera los analistas pueden aprovechar el tiempo que se ahorra al emplear estas técnicas en otras labores de importancia, como aseguramiento y planificación de calidad. De la misma manera, los altos costes que acarrear el almacenamiento y bodegaje de lotes de producción hace conveniente la liberación pronta de producto terminado al mercado, lo cual se logra realizando análisis rápidos.

La implementación de métodos rápidos en el laboratorio aporta múltiples beneficios como ahorro de tiempo y trabajo, exactitud, precisión y consistencia en

los resultados, fácil interpretación microbiológica, ahorro en espacio y almacenamiento, así como gastos generales de la operación

De esta manera, los esfuerzos de las empresas productoras y distribuidoras de las técnicas de recuento rápido deben estar enfocados a capacitar y persuadir al cliente en cuanto al ahorro que representa el reducir pasos al momento de realizar un análisis microbiológico, de igual manera se hace necesario ofrecer promociones y obsequios que se conviertan en una ventaja para la venta del producto, como también ofrecer un acompañamiento y un soporte dedicado al cliente, ayudándole de esta manera a encontrar soluciones a sus necesidades particulares. Todo lo anterior, debido a que el empleo de medios deshidratados es actualmente la opción de mayor acogida en el mercado, ya que la inversión en insumos y reactivos es aparentemente menor en comparación con los costos de las técnicas rápidas. Es importante mencionar que en este matriz de costos no se tuvieron en cuenta los costos de equipos, consumo de energía, consumo de agua, desechos, etc.

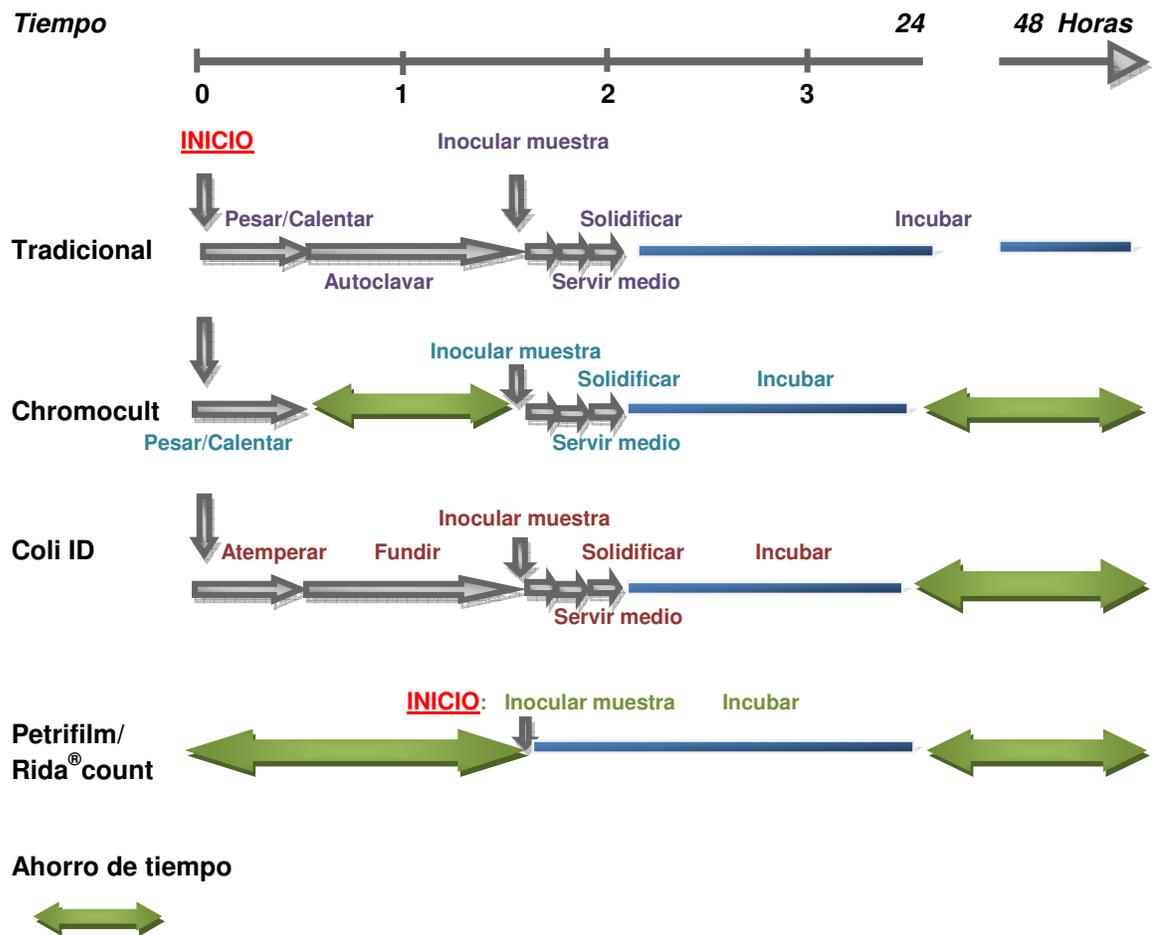


Figura 3. Tiempo requerido para el montaje de una muestra por triplicado utilizando Técnica tradicional, Placas Petrifilm™, Placas Rida Count y Coli ID.

Ahorro de espacio

Las placas Petrifilm y Rida count al ser láminas permiten ahorrar espacio en las incubadoras, de esta manera no se afecta la capacidad de análisis del laboratorio debido a la insuficiencia de espacio en las incubadoras.



10 Cajas

=



10 placas

Figura 4. Ahorro de espacio en la incubadora, Placas Petrifilm™, Placas Rida Count y Cajas de petri

TABLA 9. COSTO TOTAL DE ANÁLISIS PARA EL MONTAJE DE UNA MUESTRA (TRIPLICADO)

| TÉCNICA | ANÁLISIS | COSTO TOTAL (POR UNIDAD) | COSTO TOTAL (POR TRIPLICADO) |
|--------------------|---|--------------------------|------------------------------|
| MÉTODO TRADICIONAL | MESÓFILOS AEROBIOS | \$ 5.672 | \$ 6.600 |
| | ENTEROBACTERIAS | \$ 5.805 | \$ 7.808 |
| | <i>E. COLI</i> /COLIFORMES (chromocult) | \$ 6.698 | \$ 15.838 |
| | <i>E. COLI</i> /COLIFORMES (COLI ID) | \$ 6.781 | \$ 25.477 |
| | COLIFORMES (VRB) | \$ 5.744 | \$ 7.251 |
| | NMP DE COLIFORMES | \$ 5.645 | \$ 6.938 |
| | <i>E. COLI</i> (TBX) | \$ 6.014 | \$ 13.792 |
| | <i>S. AUREUS</i> | \$ 6.533 | \$ 15.693 |
| | HONGOS Y LEVADURAS | \$ 5.985 | \$ 7.872 |
| PETRIFILM | MESÓFILOS AEROBIOS | \$ 4.157 | \$ 20.189 |
| | ENTEROBACTERIAS | \$ 4.383 | \$ 22.225 |
| | RAPIDO COLIFORMES | \$ 7.489 | \$ 50.178 |
| | <i>E. COLI</i> /COLIFORMES | \$ 7.019 | \$ 45.944 |
| | <i>S. AUREUS</i> | \$ 13.083 | \$ 100.523 |
| RIDA COUNT | HONGOS Y LEVADURAS | \$ 4.919 | \$ 27.044 |
| | MESÓFILOS AEROBIOS | \$ 4.447 | \$ 22.799 |
| | ENTEROBACTERIAS | \$ 5.508 | \$ 32.346 |
| | COLIFORMES | \$ 4.982 | \$ 27.614 |
| | <i>E. COLI</i> /COLIFORMES | \$ 6.935 | \$ 45.228 |
| | <i>S. AUREUS</i> | \$ 6.546 | \$ 41.690 |
| | HONGOS Y LEVADURAS | \$ 5.510 | \$ 32.365 |

Los costos totales son el resultado de la suma de los insumos en las cantidades necesarias para cada uno de los montajes mas la mano de obra teniendo en cuenta el costo por minuto de labor

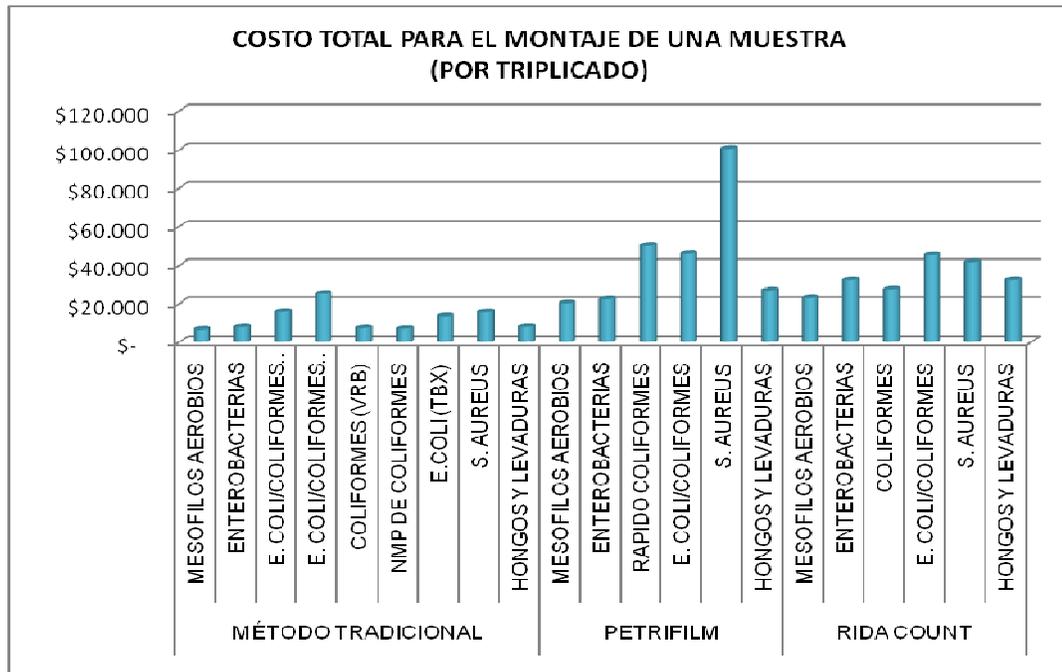


Figura 5. Costo total para el análisis de una muestra (Por Triplicado)

6.3 Unidades de Empaque

6.3.1 Medios de Cultivo (Scharlau)

Cada frasco de medio de cultivo viene embolsado de forma unitaria para proteger del polvo y acompañado del pertinente certificado de análisis y del certificado de garantía de ausencia del agente causal de la encefalopatía espongiiforme bovina en la materia prima de origen animal usada en su fabricación. Este nuevo embolsado sellado al vacío y llamado PAC-O-VAC® garantiza a los productos una extraordinaria protección frente a la contaminación, la humedad, las partículas de polvo y los microorganismos asegurando condiciones óptimas de almacenamiento y prevención de alteraciones de sus propiedades físicas y organolépticas. Las presentaciones habituales son en frascos de 100 y 500 gramos, pero también existe la posibilidad de fabricar todos estos medios en bulks de 5, 10 y 25 kg. (Fig. 5)

La información que trae el empaque se encuentra en cuatro idiomas diferentes: español, alemán, italiano y especifica la composición en gramo/litro y las instrucciones de reconstitución.

Los medios deshidratados Scharlau pueden ser almacenados en un ambiente seco en un intervalo de temperatura comprendido entre 4°C y 30°C como se especifica en el envase.

El certificado de análisis y de garantía que acompaña el frasco se encuentra en idioma inglés y comprende la información clara y general del medio como lo es: identificación, fecha de vencimiento, apariencia, color, instrucciones de preparación, condiciones y características de crecimiento, así mismo tiene ilustraciones de la morfología macroscópica típica que se da en el medio.

Los medios deshidratados presentan un periodo vida útil de cuatro años, lo cual constituye una excelente ventaja, ya que los requerimientos de almacenamiento y el tiempo para que estos sean utilizados no son exigentes y permite que estos sean empleados por largo tiempo y en múltiples análisis.

Scharlau ofrece la posibilidad de hacer consultas a través de su página web www.scharlau.com desde cualquier lugar. A través de esta página se puede tener acceso al catálogo de productos, especificaciones de cada producto, así como los datos físico químicos, toxicológicos, de seguridad y transporte actualizados. Igualmente a través de la página se puede acceder a los certificados de análisis y a las hojas de seguridad de todos los productos. Adicionalmente la página ofrece la información comercial suficiente sobre cada uno de los productos.

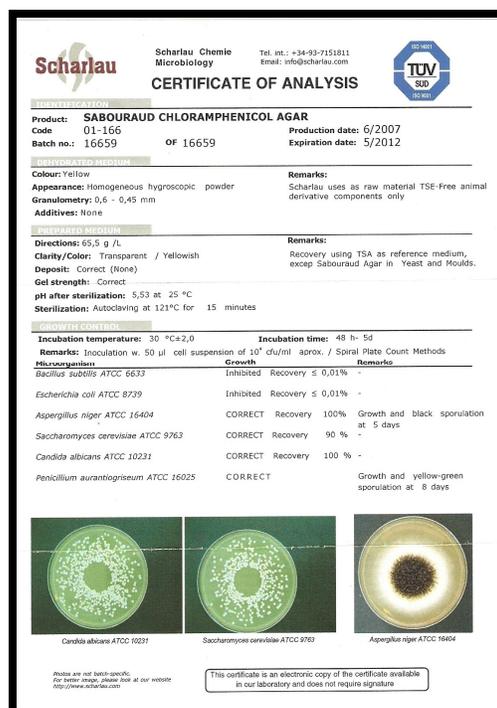
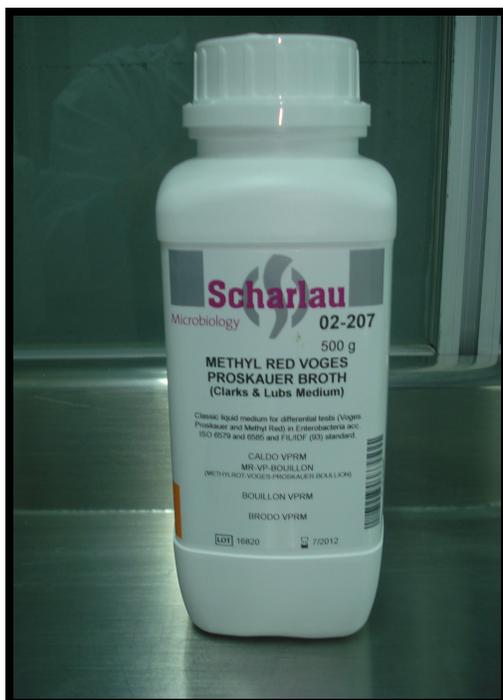


Figura 6. Presentación de los medios de cultivo Scharlau y certificado de análisis

Fuente: Autor

6.3.2 Medio cromogénico CHROMOCULT (Merck)

Cada frasco de medio de cultivo viene en una presentación habitual de 500 g, no tiene ningún tipo de empaque que lo proteja de golpes. La información contenida en la etiqueta se encuentra en cuatro idiomas diferentes con las instrucciones de preparación y de almacenamiento. No especifica vida útil, pero si fecha de expiración, de esta manera se calcula que la vida útil es de cuatro años.

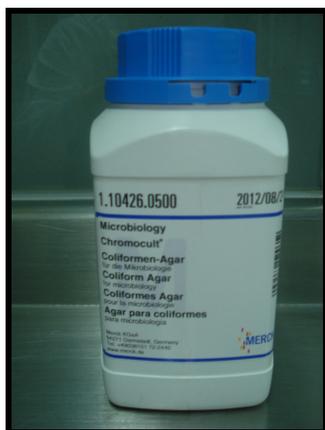


Figura 7. Presentación del medio cromogénico CHOMOCULT (Merck)

Fuente: Autor

6.3.3 Placas Petrifilm™

Las Placas Petrifilm™ 3M se presentan empacadas en bolsas de foil de aluminio que las protegen de la humedad y de la luz, estas bolsas en algunos casos contienen 25 unidades y otras 50 unidades según su presentación. Las placas miden 7.5cm de ancho x 9.5cm de largo.

Las bolsas de placas Petrifilm sin abrir se deben conservar a una temperatura < 8 °C. Antes de usarlas se deben dejar hasta que lleguen a temperatura ambiente. Las bolsas no se deben exponer a la humedad y se deben sellar bien después de cerrarlas en una ambiente seco y fresco. La exposición de las placas Petrifilm a temperaturas > 25°C y/o humedades relativas >50% pueden afectar su funcionamiento.

La fecha de caducidad de las Placas es de aproximadamente 18 meses a partir de la fecha de manufactura, siempre y cuando se almacenen y conserven en las condiciones adecuadas. Una vez abiertas las bolsas cuentan con una vida útil de 30 días a temperatura ambiente.

Cada paquete tiene impreso la fecha de caducidad, número de lote, temperatura de almacenamiento y número de unidades. Igualmente tiene la información impresa con letra de color diferente para cada microorganismo respectivamente y viene en (8) ocho idiomas diferentes. Viene con un certificado de conformidad

que garantiza que las placas han sido probadas y cumplen con los estándares de funcionamiento de cada una de las placas. (Fig 8)



Fuente: Autor

| 3M 3M™ Petrifilm™ – Coliform Count Plates | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|---|------------------|------------------------------------|-----------------------------------|---|---|--|-------------------------------|-------------------------------------|-----------------|--|-----------|-----------|
| Product Information | | | | | | | | | | | | | | |
| MEDIUM: | Petrifilm™ Coliform Count plates (S40/S46) | | | | | | | | | | | | | |
| ISO/RSI CERTIFICATE OF REGISTRATION NUMBER: | 3M Microbiology is certified to ISO-9001:2000, FM 14552 Manufactured at Brookings, South Dakota, U.S.A. | | | | | | | | | | | | | |
| DATE OF EXPIRATION/LOT NUMBER: | Expiry and lot number indicated on each package. Lot number indicated on each plate. | | | | | | | | | | | | | |
| FORMULATION: | Violet red bile/glucose nutrients, cold water soluble gel, tetrazolium indicator | | | | | | | | | | | | | |
| METHOD OF PREPARATION: | Nutrients and gels coated onto film. For use, hydrate with one ml aqueous sample or dilution of sample. See product package insert for detailed instructions. | | | | | | | | | | | | | |
| CONTAMINATION CHECK: | Minimum 80 plates per batch tested Incubated at 32°C for 24 hours Columbia sequential sampling attributes plan | | | | | | | | | | | | | |
| EFFICACY CHECK: | Complement of organisms tested includes, among others: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Organism</th> <th>Result</th> <th>Acceptable Batch</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Escherichia coli</i> ATCC 5183</td> <td>Growth with Gas</td> <td rowspan="4">Counts not lower than 3 standard deviations below the count on VRB agar plates.</td> </tr> <tr> <td><i>Enterobacter amnigenus</i> ATCC 5186</td> <td>Growth with Gas</td> </tr> <tr> <td><i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 5187</td> <td>Growth with Gas</td> </tr> <tr> <td><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4556</td> <td>No Growth</td> <td>No Growth</td> </tr> </tbody> </table> | Organism | Result | Acceptable Batch | <i>Escherichia coli</i> ATCC 5183 | Growth with Gas | Counts not lower than 3 standard deviations below the count on VRB agar plates. | <i>Enterobacter amnigenus</i> ATCC 5186 | Growth with Gas | <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 5187 | Growth with Gas | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4556 | No Growth | No Growth |
| Organism | Result | Acceptable Batch | | | | | | | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 5183 | Growth with Gas | Counts not lower than 3 standard deviations below the count on VRB agar plates. | | | | | | | | | | | | |
| <i>Enterobacter amnigenus</i> ATCC 5186 | Growth with Gas | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 5187 | Growth with Gas | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4556 | No Growth | | No Growth | | | | | | | | | | | |
| ISO 11033: | Meets the applicable criteria for routine quality control and microbiological performance of ISO 11033. <table border="1"> <thead> <tr> <th>Organism</th> <th>Acceptable Batch</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Escherichia coli</i> ATCC 25822</td> <td>Productivity Ratio \geq 0.5</td> </tr> <tr> <td><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212</td> <td>Total Inhibition</td> </tr> <tr> <td><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</td> <td>Atypical of Coliform Colonies</td> </tr> </tbody> </table> | Organism | Acceptable Batch | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25822 | Productivity Ratio \geq 0.5 | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | Total Inhibition | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | Atypical of Coliform Colonies | | | | | |
| Organism | Acceptable Batch | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25822 | Productivity Ratio \geq 0.5 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 | Total Inhibition | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | Atypical of Coliform Colonies | | | | | | | | | | | | | |
| PACKAGING: | Pack size: 25 plates per foil pouch Film grade: Plastic foil laminate Seal integrity check: Delamination seal integrity test performed | | | | | | | | | | | | | |
| MEASUREMENT SYSTEMS CALIBRATION AND TRACEABILITY: | Incubator temperature: 3M internal calibration. Minimum calibration once per year for all equipment. | | | | | | | | | | | | | |
| MEDIA QUALITY STATEMENT: | Quality assurance certificate included in package | | | | | | | | | | | | | |
| SHELF LIFE: | 18 months from date of manufacture | | | | | | | | | | | | | |
| STORAGE CONDITIONS: | Store at temperatures less than or equal to 8°C | | | | | | | | | | | | | |
| SIGNED: | L.H. Pomeroy Quality Assurance Specialist | | | | | | | | | | | | | |

Fuente: 3M

Figura 8. Presentación del empaque de las Placas Petrifilm™ y carta con información del producto.

Cada Placas Petrifilm™ tiene impreso en la parte superior el número de lote y la abreviatura del nombre del microorganismo para lo cual es empleada. (Fig 9)

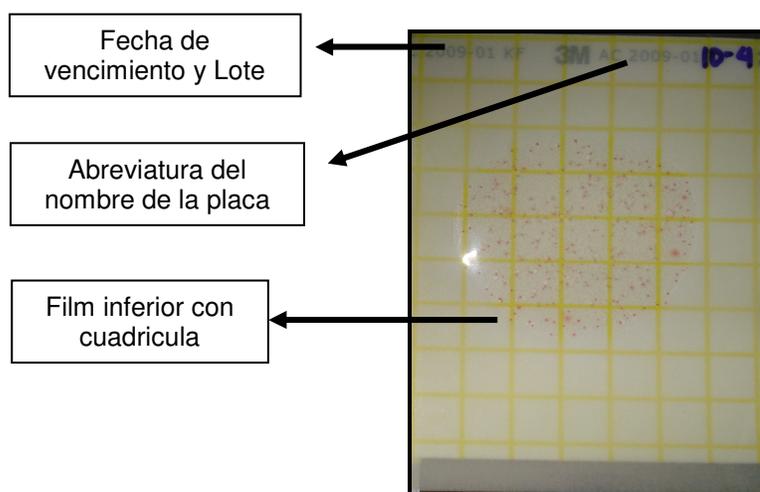


Figura 9. Información adjunta en cada una de las 3M Placas de Petrifilm
Fuente: Autor

El descarte y destrucción de las placas se debe hacer de acuerdo a las normas industriales, ya puede contener microorganismos viables que pueden ser un riesgo biológico potencial.

Toda la información acerca de la descripción del producto, instrucciones de uso, vida útil, aplicaciones, empaque, condiciones de almacenamiento e instrucciones de eliminación se encuentra a la vez disponible en la página web de 3M.

TABLA 10. Unidades por empaque de las Placas Petrifilm™.

| Descripción del producto | Unidades por empaque |
|--|----------------------|
| Placas Petrifilm Staph Express para Staph aureus | 25 |
| Placas Petrifilm para Aerobios totales | 50 |
| Placas Petrifilm Coliformes | 25 |
| Placas Petrifilm para <i>E.coli</i> / Coliformes | 50 |
| Placas Petrifilm para Mohos y Levaduras | 50 |
| Placas Petrifilm para Enterobacterias | 25 |

| | |
|---|----|
| Placas Petrifilm de Rápido de Coliformes | 25 |
| Placas de Petrifilm de alta sensibilidad para Coliformes | 25 |
| Placas Petrifilm para monitoreo de <i>Listeria</i> en ambientes | 25 |

6.3.4 Rida count

Las láminas Ridacount se comercializan en cajas de cartón color blanco, cada una de ellas contiene 10 sobres de aluminio con 10 láminas cada uno. Dentro de cada caja hay una ficha técnica del producto, la cual no es específica para cada lámina, si no que contiene la información general que contempla: instrucciones de uso, aprobaciones, fundamento de la prueba, color de las colonias, material requerido para los análisis, cuidados y precauciones, condiciones de almacenamiento y resultados. Esta información consignada en la ficha técnica solo se encuentra disponible en idioma ingles. (Fig 10). Cada sobre de láminas tiene un código de color para cada tipo de placa e información de contenido y nombre en dos idiomas: ingles y alemán. Así mismo, dentro de cada caja viene una copia certificado de control de calidad de cada producto en idioma ingles. Adicionalmente, viene un modelo grafico para la interpretación de los resultados.



Figura 10. Presentación de los empaque de las Placas de Rida Count.

Fuente: Autor

Las Placas de Rida[®]count tiene una vida útil de 24 meses para Mesofilos, Enterobacterias, *E. coli* y *E. coli*/Coliformes, 36 meses para coliformes, 18 meses para *S. aureus*, 15 meses *Salmonella*, 12 meses hongos y levaduras. Su conservación se debe realizar a una temperatura de 2-15 °C. Después de abiertos los sobres solo se pueden mantener en nevera por un mes.

Para Mesófilos la franja es de color amarillo, *E.coli*/Coliformes es de color Verde oscuro, Hongos y levaduras es de color verde claro, Coliformes es de color azul, Enterobacterias es de color purpura, *S. aureus* es de color rojo.

Cada placa además de tener el código de color, viene marca con el nombre del microorganismo.

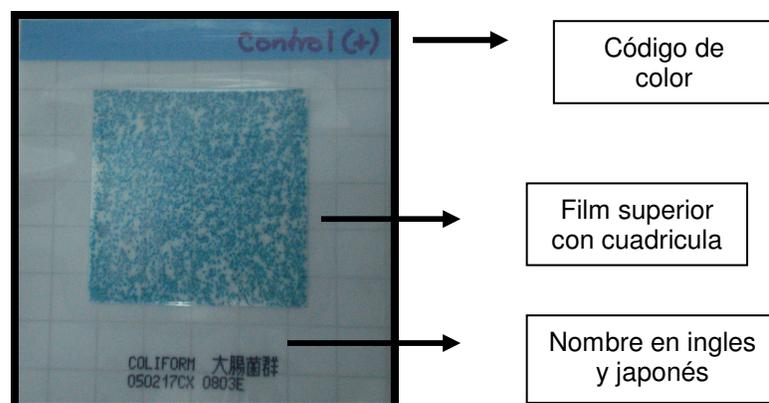


Figura 11. Información adjunta en cada una de las Placas de Rida Count
Fuente: Autor

6.3.5 Coli ID

El medio cromogenico Coli ID, es un medio listo para el empleo, se comercializa en una caja la cual contiene (6) seis frascos con 200 ml cada uno. Los frascos se deben conservar a una temperatura de 2-8°C hasta la fecha de caducidad y se deben proteger de la luz. En la caja viene la información de referencia, fabricante, límite de temperatura, fecha de caducidad, código de lote en idioma francés, español, alemán, portugués, ingles, etc. Adicionalmente al interior de la caja vienen las instrucciones de utilización, en las cuales viene registrado el

fundamento, presentación, composición, reactivos y material necesario no suministrado, precauciones de utilización, limitaciones, control de calidad, eliminación de residuos y aprobaciones del producto. Esta información se encuentra disponible en (7) siete idiomas diferentes. (Fig 12)



Figura 12. Presentación del medio cromogenico Coli iD
Fuente: BioMerieux

6.4 Canales de Venta

6.4.1 Placas Petrifilm™: Actualmente las placas Petrifilm están siendo distribuidas y comercializadas en el centro del país (Bogotá) por Quíos Ltda., una empresa dedicada a la comercialización de medios de cultivo y productos de laboratorio de la industria de alimentos, cosmética, farmacéutica, aguas, universidades, centros de investigación y laboratorios de diagnóstico. Laboratorios Wacol es distribuidor autorizado para la zona de la Costa, Bogotá, Eje Cafetero, Santander y Cali. La Comercializadora Intermed distribuye los productos de 3M en Medellín.

TABLA 11. Distribuidores autorizados de las 3M Placas Petrifilm.

| DISTRIBUIDOR | DATOS DE CONTACTO |
|----------------------------------|--|
| QUIOS LTDA | <p>HUMBERTO ORTIZ Av 13 (Autop Norte No. 86-97) Bogotá DC Tel: 6165801-2181054 Cel: 3124877319</p> |
| LABORATORIOS WACOL | <p>Carrera 29 No.10-64 Bogotá D.C Celular: 315 601 34 32 - 315 601 34 72 Tel: 370 74 36 - 371 26 25 Correo electrónico: servicioalcliente@wacol.com.co</p> <p>XIOMARA MEZA Barranquilla: Cel: 3138861915</p> <p>ALEJANDRA OJEDA Bucaramanga: Cel: 313 8861916</p> <p>MIYERLANDY AYALA Cali: Cel: 313 8861917</p> <p>CAROL ROMERO Eje Cafetero: 320 3454521</p> <p>SANDRA CASA Cartagena: 313 8861918</p> |
| COMERCIALIZADORA INTERMED | <p>Carrera 43ª N ° 14-109 Medellín Tel: (4) 3123300 – (4) 2668001 Fax: (4) 3524821</p> |

6.4.2 Placas RIDA COUNT: Las placas Ridacount en la actualidad están siendo comercializadas en diferentes partes del mundo, la corporación **Chisso** vende este producto directamente en el país (Japón), bajo la marca comercial Sanita-Kun tests. Por otra parte, R-Biopharm AG, Alemania distribuye globalmente las placas bajo el nombre de Rida[®] Count. El principal distribuidor en Colombia es Basic Farm Ltda., quien cuenta con diferentes contactos en todo el territorio nacional para la comercialización y distribución del producto.

A través de internet la información no es de fácil acceso; Para tener acceso a la información de Rida[®]count se debe hacer a través de la pagina de la Corporación Chisso www.chisso.co.jp ó www.r-biopharm.com la información encontrada en esta pagina solo se encuentra disponible en ingles y en japonés.

TABLA 12. Distribuidores autorizados de la Placa RIDA COUNT

| DISTRIBUIDOR | DATOS DE CONTACTO |
|-------------------------------|--|
| <u>BASIC FARM LTDA</u> | VICTORIA E. GONZALEZ Avenida Caracas 72 A 47 Bogotá Cel. 3117482858 Tel. (1) 3463003 Fax. (1) 2128830 bfarm@etb.net.co |
| JORGE ENRIQUE VALLEJO | Bogotá Cel: 3138513461 |
| LAURA MARTINEZ | Barranquilla - Atlántico Cel: 3163961607 - 3008732135 |
| JOSE ROBERTO RESTREPO | Medellín - Antioquia Cel: 3108453097 |

| | |
|---|--|
| AMANDA LUCIA QUESADA | Bucaramanga - Santander Cel: 3153963640 |
| ALEJANDRA MARTINEZ | Pereira - Risaralda Cel: 3132040378 |
| BIOGENIX | MR JOSE LAGUADO Parque central Bavaria Carrera 13 A Nª 28-38 Ofic 231 Bogota DC Tel: 0057 13368405 Fax: 0057 13368593 Mail: jose_laguado@biogenix.com.co |
| <u>FILTRACIÓN Y ANÁLISIS LTDA.</u> | MARISOL VALDES GARCIA Calle 33B # 83C -36 Medellin Antioquia E-Mail: info@filtracionyanalisis. Teléfono: 57 (4) 2507554 Fax: 57 (4) 4117340 |

6.4.3 Medios de Cultivo: Scharlau

Los medios de cultivo deshidratados marca Scharlau actualmente están siendo comercializados por la empresa Scharlau directamente, a través de sus asesores comerciales, por Annar Diagnostica Import Ltda una importadora y comercializadora de reactivos y equipos de laboratorio a nivel nacional.

Una ventaja comercial que tiene Scharlau, es que cuenta con un sistema intranet lo cual permite que sus distribuidores y agentes de venta tengan acceso inmediato y directo a la disponibilidad del stock, precios, etc. Lo cual permite dar una respuesta rápida y eficaz a las consultas de sus clientes desde cualquier lugar del mundo.

TABLA 13. Distribuidores autorizados de los medios de cultivo Scharlau.

| DISTRIBUIDOR | DATOS DE CONTACTO |
|-------------------------------|---|
| SCHARLAU | COLOMBIA Tel. 902 201898 Fax. 900 502935 E-mail. scharlab@scharlab.com |
| ANNAR DIAGNOSTICA IMPORT LTDA | BIBIANA BLANCO S. Tel. 6203255 Cel. 315 8022750 E-mail: annar@cable.net.co |

6.4.4 Médios Cromogénicos: Merck

TABLA 14. Distribuidores autorizados del medio Cromogénico: Merck

| DISTRIBUIDOR | DATOS DE CONTACTO |
|--------------|--|
| MERCK | Cra. 65 nº10-95, Bogotá D.C. (Colombia) Tel: (+11) 57 1 425 5441 (+11) 57 1 425 4770 Fax: (+11) 57 1 425 5407 (+11) 57 1 420 7793 E-mail: sicmerckmerck.com.co torresmerck.com.co www.merck.com.co |

6.5 Matriz de Calidad: Casa de la calidad

A partir de 75 encuestas realizadas a las personas que se desempeñan en el área de laboratorio se construyó en primer lugar una matriz de planificación (Fig 13), a través de la cual se determinaron las necesidades y lo que busca el cliente finalmente al adoptar determinada técnica de recuento.

Dentro de los atributos del cliente se encuentra:

- Atención al cliente
- Bajos costos
- Resultados confiables
- Presentación y empaque del producto
- Reconocimiento de calidad del producto

Los atributos del cliente son en términos de este, los requisitos del producto; anteriormente se mencionaron los atributos principales, pero para realizar la matriz de planificación estos atributos se ampliaron en requisitos secundarios.

Las características equivalentes del producto, es decir las características del producto son:

- Estudios de desempeño
- Medios preparados listos para usar
- Indicadores en el medio de cultivo
- Aprobación AOAC-OMA
- Distribución mundial
- Empaque y ficha técnica en español e inglés
- Corto tiempo de incubación

- Fácil de usar
- Preciso, sensible y eficiente
- Amplio portafolio de servicios
- Colonias claras y delimitación de tamaño

Estas características equivalentes son atributos del diseño expresados en el lenguaje del diseñador y representan las características técnicas que se deben difundir en los procesos de diseño, manufactura y servicio. En el techo de la casa de la calidad se muestra las interrelaciones entre las características equivalentes. Lo cual ayudan a los intercambios que pueden surgir entre dos características.

La matriz de relación entre los atributos del cliente y las características equivalentes tiene como objetivo indicar si las características equivalentes cubren en forma adecuada los atributos del cliente.

Los puntos de venta que se sacaron en relación a la calificación donde no es fuerte la competencia son:

- Cumplir con las regulaciones nacionales e internacionales
- Ahorro de tiempo en el análisis
- Baja inversión en espacios y equipos
- Ofrecer promociones
- Soporte técnico dedicado
- Información suficiente vía internet

Se determinó la calificación de cada atributo del consumidor y se evaluaron los productos actuales (Rida[®] count, Coli ID y Chromocult) respecto a cada uno de los atributos. Este paso permite buscar oportunidades de mejora, puntos clave de venta y estrategias de propaganda.

| | |
|---|---------------------|
|  | RELACION DEBIL |
|  | RELACION MUY FUERTE |
|  | RELACION FUERTE |

A: RIDACOUNT

B: COLI ID

C: CHROMOCULT

A partir de las encuestas se determinó que los temas que le gustaría conocer a los analistas en las actividades de capacitación o charlas son: información actualizada de los distribuidores, charlas de los riesgos de los microorganismos con los que se trabaja dentro del laboratorio, soporte técnico, ventajas de emplear una técnica determinada, ofertas y promociones de los productos, capacitación del personal, control de calidad, información de nuevos productos, bioseguridad, procedimientos, información por internet, buenas prácticas de manufactura y fortalezas y debilidades de los productos.

El 100% de las encuestas fueron aplicadas a empresas que cuentan con un laboratorio propio para la realización de sus análisis. De la misma manera, se determinó que de las 75 encuestas aplicadas, el 100% emplean la técnica tradicional para realizar el análisis microbiológico de alimentos. Sin embargo un porcentaje correspondiente al 49,3 % (37 empresas) emplean simultáneamente otras técnicas rápidas, a las cuales acuden en situaciones de emergencia o cuando no disponen de la totalidad de los insumos que requieren para realizar el análisis tradicional.

TABLA 15. Número de empresas que emplean Técnica tradicional y otras Técnicas de recuento

| TÉCNICA | Número de empresas que emplean | PORCENTAJE |
|-------------|--------------------------------|------------|
| Tradicional | 75/75 | 100% |
| OTRAS | 37/75 | 49,33% |

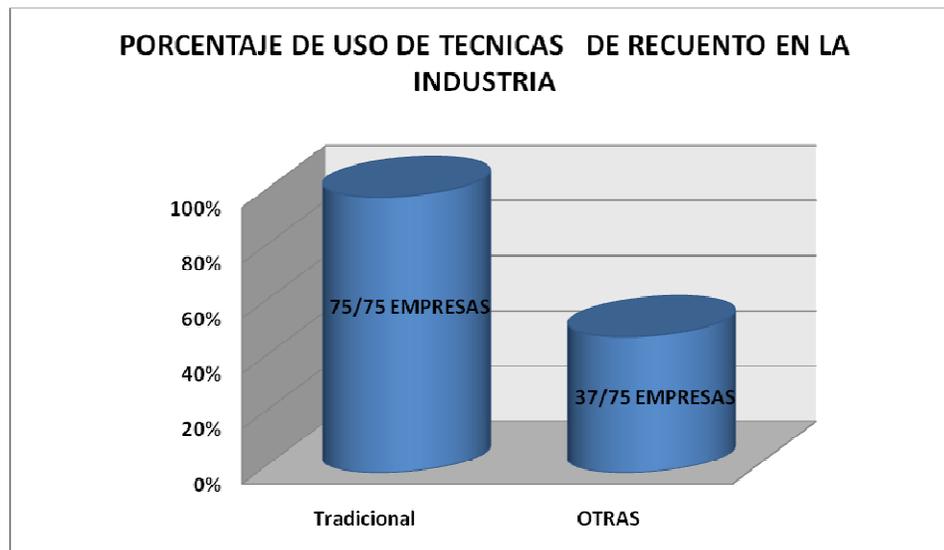


Figura 14. Porcentaje de uso de técnicas de recuento en la industrial.
Fuente. Autor

De las técnicas rápidas empleadas actualmente para el análisis microbiológico en la industria de alimentos, las Placas Petrifilm™ de 3M son empleadas por el 46% del 49,3% de las industrias, seguida por Rida®count con el 35%, Bioluminiscencia con 8%, coli ID con 5% y por último las pruebas enzimáticas y el crystal BBL con el 3% cada una.

TABLA 16. Técnicas rápidas más utilizadas para el análisis microbiológico en la industria de alimentos.

| TÉCNICAS RAPIDAS | |
|---------------------|-----------|
| TÉCNICA | CONTEO |
| Petrifilm | 17 |
| Rida®count | 13 |
| Pruebas enzimáticas | 1 |
| Bioluminiscencia | 3 |
| Coli ID | 2 |
| Crystal BBL | 1 |
| TOTAL | 37 |

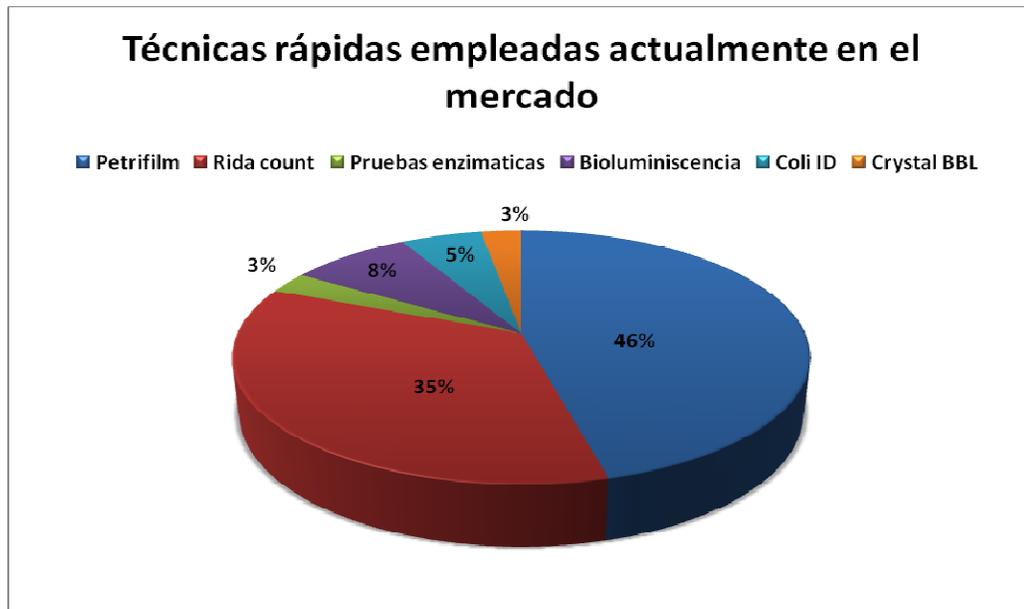


Figura 15. Técnicas rápidas empleadas actualmente en el mercado
Fuente: Autor

TABLA 17. Análisis microbiológico que se realizan habitualmente en la industria de alimentos.

| Análisis microbiológicos que se realizan habitualmente en la industria de alimentos | |
|---|-------|
| Mesófilos | 74/75 |
| Enterobacterias | 71/75 |
| Coliformes | 73/75 |
| <i>E. coli</i> | 73/75 |
| <i>S.aureus</i> | 56/75 |
| <i>Listeria</i> | 18/75 |
| Hongos y Levaduras | 59/75 |

La encuesta realizada también permitió determinar los análisis microbiológicos que se realizan comúnmente en la industria de alimentos, arrojando que 74 empresas de las 75 empresas encuestadas realizan determinación de mesófilos

aerobios, 71 empresas hacen determinación de enterobacterias, 73 empresas determinan coliformes y *E. coli* respectivamente, 56 empresas hacen determinación de *S. aureus*, 18 empresas de 75 realizan determinación de *Listeria* y 59 empresas determinan hongos y levaduras. (Figura 16)

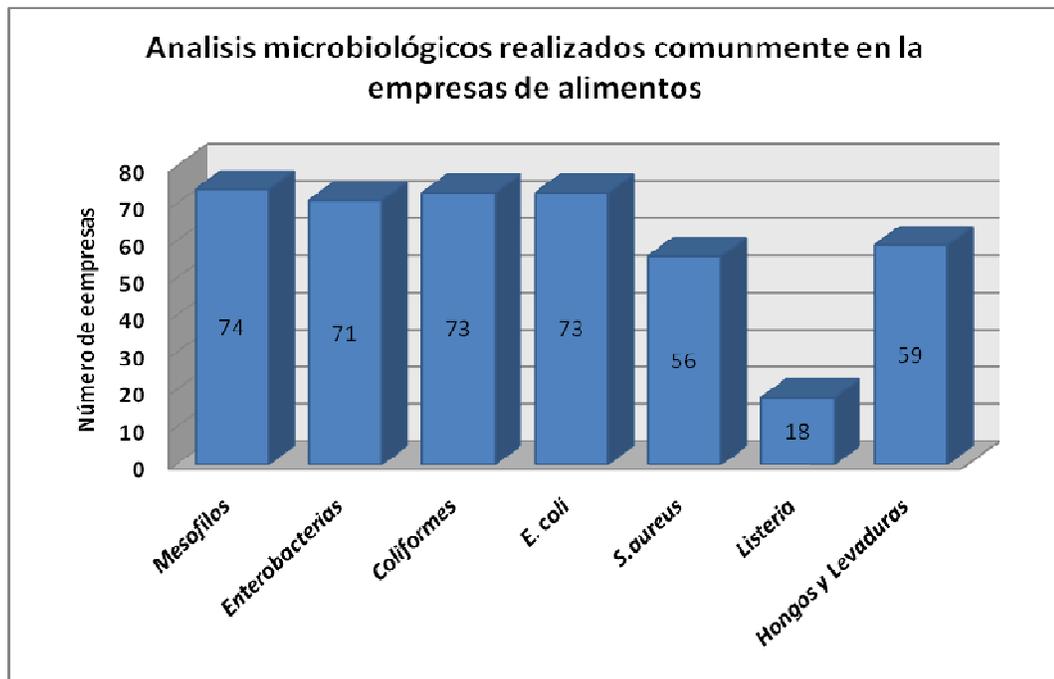


Figura 16. Análisis microbiológico realizado comúnmente en las empresas de alimentos

Fuente: Autor

A su vez se indagó sobre otro tipo de análisis que se realizan en la industria de alimentos, observándose que adicional al análisis y determinación de microorganismos indicadores de vida útil e higiene en alimentos, también se hace determinación de microorganismos patógenos, dependiendo del tipo de materias primas y productos que se elaboren. La encuesta arrojó que entre los análisis adicionales que se realizan periódicamente se encuentran determinación de *Bacillus cereus*, *Lactobacillus*, *Clostridium sulfito reductor*, *Salmonella*, *Enterococos*, *Shiguella*, *Yersinia*, microorganismos esporulados, microorganismos Psicotrófos y *Vibrio*. En la mayoría de los casos se observó, que

la determinación de *Listeria* no es realizada directamente en la empresa, si no que se recurre a los servicios de laboratorios externos. En la gráfica se observa el número de empresas de las 75 encuestas aplicadas que realizan cada uno de estos análisis.

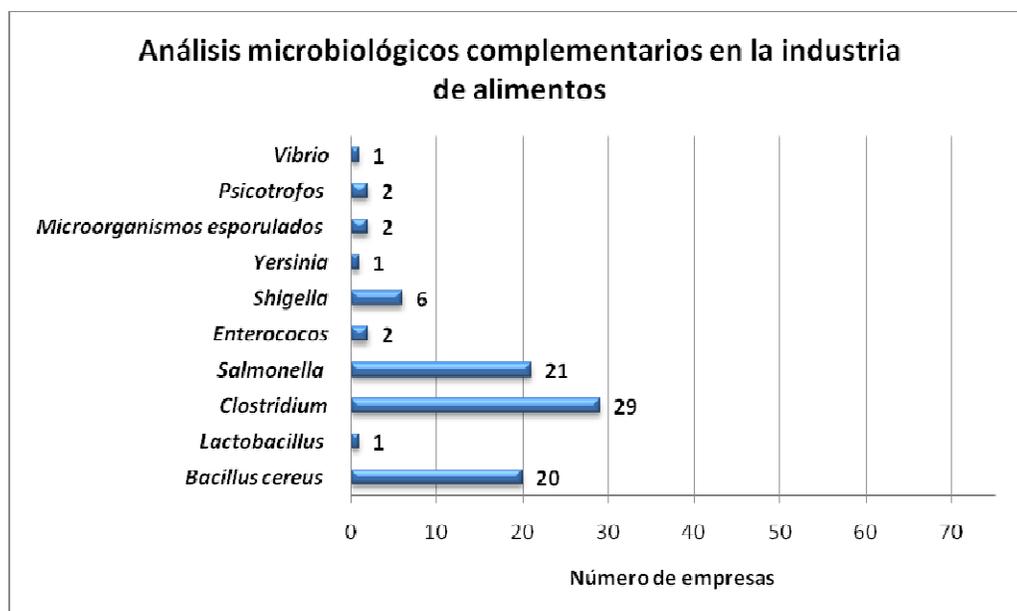


Figura 17. Analisis microbiologico complementario en la industria de alimentos
Fuente: Autor

Por otra parte, la encuesta permitió determinar la frecuencia con la cual son realizados los análisis, evidenciándose que la determinación de microorganismos indicadores de vida útil y calidad higiénica son realizados a diario por la gran mayoría de las empresas, unas pocas realizan ciertos análisis cada dos días, según la producción que se presente en la empresa.

6.6 Técnico

6.6.1 Resultados y discusión.

Se analizaron un total de 9 muestras de leche pasteurizada, queso doble crema, cuajada, crema de leche y carne de hamburguesa, las cuales fueron empleadas

para determinar la presencia de microorganismos mesófilos, Enterobacterias, coliformes totales, *E. coli*, *S. aureus* y Mohos y levaduras, empleando Placas Petrifilm, Rida[®]count, Coli ID, Chromocult, la técnica tradicional y el medio preparado Baird Parker de Biomerieux.

Las muestras se obtuvieron en supermercados del Noroccidente Bogotá, fueron transportadas al laboratorio en bolsas *Ziploc* dentro de una nevera portátil que mantuviera sus condiciones de almacenamiento adecuadas y fueron procesadas el mismo día de su compra.

Los recuentos obtenidos con cada una de las técnicas de recuento para cada una de las muestras de alimento se encuentran en el (Anexo 4).

6.6.1.1 Mesófilos:

En la tabla 18, se muestra los niveles promedio de mesófilos, desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados obtenidos a partir de las tres diferentes técnicas de recuento. Con respecto a el coeficiente de variación de la técnica tradicional, Petrifilm[™] y Rida count se observa como su diferencia es pequeña en cada una de la muestras, lo que sugiere que las técnicas de recuento son reproducibles, confiables y precisas para el recuento de mesófilos. El coeficiente de variación (máximo 10%) demuestra que hay un alto grado de concordancia entre los resultados obtenidos en las tres repeticiones realizadas a cada uno de los alimentos, ya que se presenta en un porcentaje inferior al 10%, demostrando así la varianza relativa presente entre las mediciones.

Se realizó la comparación entre las técnicas para el recuento de Mesófilos aerobios por la prueba de ANOVA, calculando el valor de P, a partir de la cual, se concluyo que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas para cada muestra, debido a que el valor de P fue mayor a 0.05 ($P > 0.05$). Para la Leche pasteurizada ($P = 0.867$), queso campesino ($P = 0.862$),

cuajada (P= 0.939), queso doble crema (P= 0.976), crema de leche 1(P= 0.647), Crema de leche 2 (P= 0.178), carne de hamburguesa 1(P= 0.971), carne de hamburguesa 2 (P= 0.239), carne de hamburguesa 3 (P= 0.992) con un alfa de 0.05.

Tabla 18. Nivel promedio de Mesófilos aerobios determinado por el método Tradicional, Placas Petrifilm™ y Placas Rida count en las muestras en estudio.

| LECHE PASTEURIZADA | | | QUESO DOBLE CREMA | | | CARNE DE HAMBURGUESA 1 | | | |
|--------------------|---------------------|-----------|-------------------|---------------------|-----------|------------------------|---------------------|-----------|------------|
| | Técnica tradicional | Petrifilm | Rida Count | Técnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count | Técnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Media | 4,8263 | 4,638 | 4,64 | 3,24 | 3,453 | 3,297 | 3,69 | 3,83 | 3,8 |
| CV | 11% | 9% | 11% | 9% | 9% | 6% | 23% | 17% | 19% |
| Stand. dev | 0,5376 | 0,401 | 0,52 | 0,3 | 0,321 | 0,2 | 0,857 | 0,653 | 0,73 |
| QUESO CAMPESINO | | | CREMA DE LECHE 1 | | | CARNE DE HAMBURGUESA 2 | | | |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Mean | 4,296 | 4,391 | 4,22 | 4,19 | 4,206 | 4,089 | 4,396 | 4,648 | 4,43 |
| CV | 7% | 10% | 9% | 19% | 13% | 14% | 3% | 4% | 4% |
| Stand. dev | 0,322 | 0,431 | 0,37 | 0,83 | 0,536 | 0,568 | 0,118 | 0,2 | 0,19 |
| CUAJADA | | | CREMA DE LECHE 2 | | | CARNE DE HAMBURGUESA 3 | | | |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Mean | 4,2613 | 4,359 | 4,13 | 4,51 | 4,518 | 4,28 | 4,468 | 4,502 | 4,6 |
| CV | 18% | 17% | 20% | 4% | 3% | 4% | 32% | 30% | 28% |
| Stand. dev | 0,7659 | 0,742 | 0,85 | 0,14 | 0,159 | 0,166 | 1,445 | 1,372 | 1,28 |

El parámetro de correlación (r) para aerobios mesófilos obtenido a partir de las Placas Petrifilm™ para mesófilos y el método tradicional usando el agar Plate Count fue de 0.9665, mientras que el obtenido con Rida Count (Fig. 18) fue de 0.9619 lo cual indica que existe una alta correlación lineal directa entre ambas técnicas, existiendo una mejor correlación entre el método tradicional y Petrifilm en comparación con el método tradicional y Rida count; Sin embargo, es claro que ambas técnicas proporcionan buenos resultados en comparación con la técnica tradicional. Los resultados obtenidos en este ensayo son equivalentes a los resultados obtenidos en otros estudios realizados para determinar mesófilos en leche pasteurizada donde el coeficiente de correlación esta en un rango de (0.78-0.98). (Beuchat et al., 1998; Blackburn et al., 1996; Curiale et al., 1990;

Ginn et al., 1986; Jordano et al., 1995; Senyk et al., 1987). Otro estudio comparativo entre el método Simplate, las placas Petrifilm y el método tradicional para la enumeración de mesófilos aerobios en leche pasteurizada desarrollado en Brasil, demostró que el coeficiente de correlación de 0.88 obtenido con Petrifilm™ AC esta entre el rango (0.80-0.89), mientras que con la otra técnica Simplate se logro un coeficiente de correlación < 0.50 , corroborando de esta manera que las placas Petrifilm para la determinación de aerobios mesófilos proporcionan resultados muy cercanos a los obtenidos empleando métodos convencionales. (Tavolaro et al., 2005).

En otro estudio se realizó la comparación de las Placas Petrifilm™ para el recuento de bacterias aerobias con un método convencional en queso blanco, para lo cual se emplearon 30 muestras. Las medias y desviaciones estándar fueron $7,18 \pm 1,17 \log \text{ UFC g}^{-1}$ en PCA y $7,11 \pm 1,05 \log \text{ UFC g}^{-1}$ en Placas Petrifilm™. El análisis de varianza demostró que no existe diferencia significativa entre ambos métodos ($t = 1,33, P = 0,193$). El coeficiente de correlación fue 0,971 ($P = 0,0001$) indicando una fuerte correlación lineal. Los resultados obtenidos con este estudio muestra a las Placas Petrifilm™ como un método apropiado y una buena alternativa para la cuantificación de flora aeróbica en queso. (G.B. de SOUSA et al. 2005)

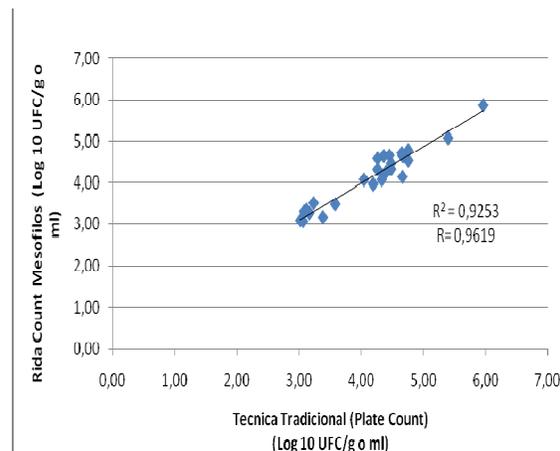
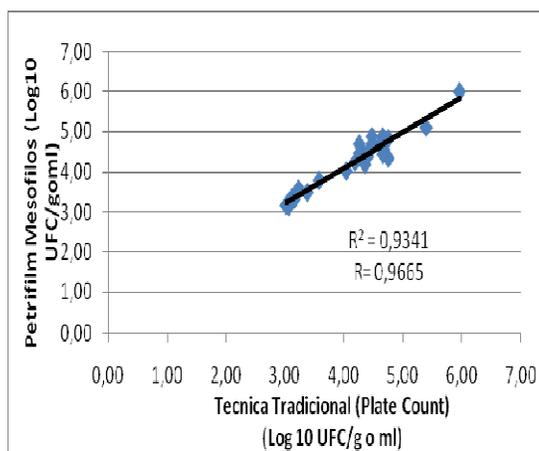


Figura 18. Coeficientes de correlación de los recuentos para la determinación de Mesófilos aerobios obtenidos con las Placas Petrifilm™ y placas Rida Count a partir de 9 grupos de alimentos.

6.6.1.2 Enterobacterias:

En la tabla 19, se puede observar el análisis estadístico de los recuentos realizados con cada una de las técnicas. Con respecto al grado de concordancia entre los recuentos, que se determinó con la desviación estándar y la media, los resultados obtenidos con las tres repeticiones para cada una de las tres técnicas de recuento, fueron en su mayoría menores del 10% CV, lo que muestra un alto grado de concordancia entre los datos. En las muestras donde el coeficiente de variación supero el 10%, se puede decir que fue producto de errores en el montaje de la técnica, como por ejemplo, el volumen inadecuado de inóculo o una mala dispersión de las diluciones de las muestras.

La probabilidad de que los recuentos en cada una de las técnicas presenten diferencias estadísticamente significativas con un nivel de significancia del 95%, se pudo determinar con los valores de P. Se concluyó que no hay diferencias estadísticamente significativas para las muestra: Leche pasteurizada (P= 0.475), queso campesino (P= 0.738), cuajada (P= 0.565), queso doble crema (P= 0.425), crema de leche 1(P= 0.371), Crema de leche 2 (P= 0.011), carne de hamburguesa 1(P= 0.025), carne de hamburguesa 2 (P= 0.713), carne de hamburguesa 3 (P= 0.421).

Tabla 19. Nivel promedio de Enterobacterias determinado por el método Tradicional, Placas Petrifilm™ y Rida count en las muestras en estudio.

| | LECHE PASTEURIZADA | | | QUESO DOBLE CREMA | | | CARNE DE HAMBURGUESA 1 | | |
|-------------------|---------------------|-----------|------------|---------------------|-----------|------------|------------------------|-----------|------------|
| | Técnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count | Técnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count | Técnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Media | 4,21233 | 4,30267 | 4,181 | 3,95567 | 4,351 | 4,29033 | 3,17167 | 3,43 | 3,23 |
| CV | 3% | 3% | 2% | 2% | 11% | 10% | 2% | 1% | 4% |
| Stand. Dev | 0,135301 | 0,13436 | 0,0792 | 0,08286 | 0,479313 | 0,419469 | 0,06352 | 0,043405 | 0,12111 |
| | QUESO CAMPESINO | | | CREMA DE LECHE 1 | | | CARNE DE HAMBURGUESA 2 | | |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Media | 3,74167 | 4,20267 | 4,0027 | 3,417 | 3,732 | 3,77333 | 5,20633 | 5,008 | 4,83967 |
| CV | 21% | 14% | 14% | 3% | 5% | 13% | 3% | 11% | 15% |
| Stand. Dev | 0,783966 | 0,58189 | 0,7462 | 0,09354 | 0,196665 | 0,493722 | 0,14694 | 0,561914 | 0,71545 |
| | CUAJADA | | | CREMA DE LECHE 2 | | | CARNE DE HAMBURGUESA 3 | | |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Media | 4,77967 | 4,62467 | 4,4863 | 5,40333 | 5,52033 | 5,119 | 5,42267 | 5,50133 | 5,413 |
| CV | 3% | 9% | 7% | 1% | 3% | 2% | 1% | 2% | 1% |
| Stand. Dev | 0,13408 | 0,42666 | 0,3302 | 0,07295 | 0,146439 | 0,101015 | 0,05518 | 0,110065 | 0,07686 |

El parámetro de correlación (r) para Enterobacterias obtenido a partir de las placas de Petrifilm y el método tradicional usando el agar Mac Conkey fue de 0.9152, mientras que el obtenido con Rida Count (Fig. 19) fue de 0.8875 lo cual indica que existe una alta correlación lineal directa entre ambas técnicas, existiendo una mejor correlación entre el método tradicional y Petrifilm en comparación con el método tradicional y Rida count.

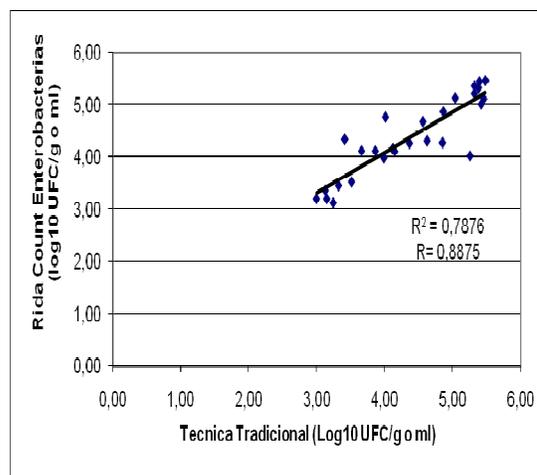
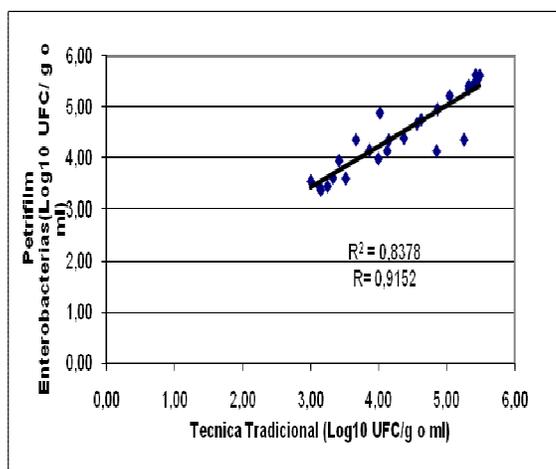


Figura 19. Coeficientes de correlación de los recuentos para la determinación de Enterobacterias obtenidos con las Placas Petrifilm 3M y placas Rida Count a partir de 9 grupos de alimentos.

6.6.1.3 Coliformes:

En la tabla 20, se muestra los niveles promedio de Coliformes, desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados obtenidos a partir de las tres diferentes técnicas de recuento. Con respecto al coeficiente de variación de la técnica tradicional, Petrifilm y Rida count se puede decir que hay un alto grado de concordancia entre los resultados para las 9 muestras de alimentos. En las muestras donde el coeficiente de variación supero el 10%, se puede decir que fue resultado de errores en el montaje de la técnica.

Se determinó que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas para cada muestra siendo el valor de P en la prueba de ANOVA > 0.05 ; obteniendo como resultado para el queso campesino ($P= 0.682$) queso doble crema ($P= 0.195$), crema de leche 1 ($P= 0.537$), Crema de leche 2 ($P= 0.082$), carne de hamburguesa 1 ($P= 0.632$).

Existe diferencias estadísticamente significativas entre las tres técnicas para las siguientes muestras: Leche pasteurizada ($P= 0.001$), cuajada ($P= 0.009$), carne de hamburguesa 2 ($P= 0.02$), carne de hamburguesa 3 ($P= 0.01$).

Tabla 20. Nivel promedio de Coliformes determinado por el método Tradicional, Placas Petrifilm y Placas Rida count en las muestras en estudio.

| | LECHE PASTEURIZADA | | | QUESO DOBLE CREMA | | | CARNE DE HAMBURGUESA 1 | | |
|-------------------|---------------------|-----------|------------|---------------------|-----------|------------|------------------------|-----------|------------|
| | Técnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count | Técnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count | Técnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Media | 2,404 | 3,14767 | 3,12 | 3,777 | 4,25633 | 3,91433 | 3,293 | 3,414 | 3,43267 |
| CV | 3% | 5% | 4% | 5% | 9% | 6% | 5% | 9% | 3% |
| Stand. dev | 0,065391 | 0,155597 | 0,11666 | 0,198 | 0,39035 | 0,245993 | 0,147 | 0,308028 | 0,073201 |
| | QUESO CAMPESINO | | | CREMA DE LECHE 1 | | | CARNE DE HAMBURGUESA 2 | | |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Media | 3,623 | 3,65133 | 4,10333 | 3,598 | 3,66633 | 3,739 | 5,784 | 5,68833 | 4,89133 |

| | | | | | | | | | |
|------------|----------|----------|---------|------------------|---------|----------|------------------------|----------|----------|
| CV | 2% | 3% | 24% | 2% | 3% | 6% | 9% | 2% | 2% |
| Stand. dev | 0,057166 | 0,097125 | 1,0061 | 0,071 | 0,10374 | 0,222852 | 0,51709 | 0,118421 | 0,113298 |
| | CUAJADA | | | CREMA DE LECHE 2 | | | CARNE DE HAMBURGUESA 3 | | |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Media | 4,765 | 5,03833 | 4,38 | 3,976 | 3,92667 | 3,76033 | 5,256 | 5,439 | 4,689 |
| CV | 3% | 2% | 3% | 3% | 2% | 3% | 3% | 4% | 6% |
| Stand. dev | 0,159557 | 0,12761 | 0,12437 | 0,138 | 0,05142 | 0,11893 | 0,16333 | 0,226343 | 0,278948 |

El parámetro de correlación (r) para Coliformes obtenidos a partir de las placas de Petrifilm Coliformes y el método tradicional usando el agar VRB fue de 0.953, mientras que el obtenido con Rida Count (Fig 20) fue de 0.941 lo cual indica que existe una alta correlación lineal directa entre ambas técnicas, existiendo una mejor correlación entre el método tradicional y Petrifilm en comparación con el método tradicional y Rida count. Con respecto a otros estudios realizados en la universidad de Córdoba, donde el objetivo era comparar las técnicas alternativas para el análisis microbiológico de los alimentos; El análisis estadístico de los resultados obtenidos con la Placa Petrifilm serie 2000 y con VRBA, en los grupos de seis lotes de alimentos mostró un coeficiente de correlación de (r) = 0.860 y se compararon las medias entre las dos técnicas donde se observó resultados muy cercanos. Concluyendo que Petrifilm Series 2000 (recuento rápido de coliformes) puede considerarse una alternativa válida a la Microbiología tradicional. (Jordano et al., 1995)

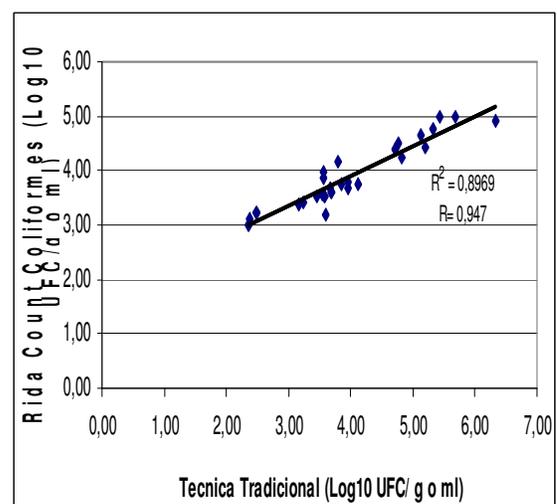
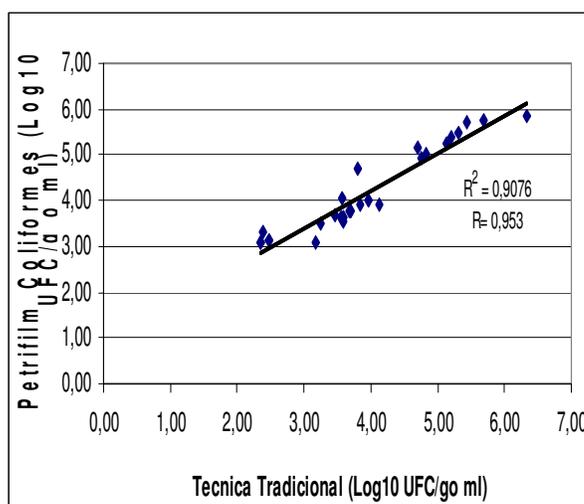


Figura 20. Coeficientes de correlación de los recuentos para la determinación de Coliformes fecales obtenidos con las Placas Petrifilm 3M y placas Rida Count a partir de 9 grupos de alimentos.

6.6.1.4 *E. coli*:

En la tabla 21, se puede observar el análisis estadístico de los recuentos realizados para cada de las técnicas, como los niveles promedio de *E. coli*, desviación estándar y el coeficiente de variación obtenidos a partir de las tres diferentes técnicas de recuento para los 9 grupos de alimentos.

Con referencia a el coeficiente de variación que determina el grado de concordancia entre los recuentos, los resultados obtenidos con las tres repeticiones en cada una de las cuatro técnicas de recuento fueron en su mayoría menores del 10%, esto nos indica que hay alta concordancia entre los recuentos, sugiriendo que las Técnicas son reproducibles y confiables para el análisis microbiológico de alimentos.

La probabilidad de que los recuentos en cada una de las técnicas tengas diferencias estadísticamente significativas con un nivel de significancia del 95%, se determino con los valores de P; donde se puede concluir que no hay diferencias estadísticamente significativas para las muestras: Leche pasteurizada (P= 0.09), queso campesino (P= 0.12), cuajada (P= 0.065), queso doble crema (P= 0.096), crema de leche 1(P=.986), Crema de leche 2 (P= 0.092), carne de hamburguesa 1(P= 0.661), carne de hamburguesa 2 (P= 0.204), carne de hamburguesa 3 (P= 0.775) con un alfa de 0.05.

Tabla 21. Nivel promedio de *E. coli* determinado por el método Tradicional, Placas Petrifilm™, Placas Rida count y Coli ID en las muestras en estudio.

| | LECHE PARTEURIZADA | | | | QUESO DOBLE CREMA | | | | CARNE DE HAMBURGUESA 1 | | | |
|----------|---------------------|-----------|------------|---------|---------------------|-----------|------------|---------|------------------------|-----------|------------|---------|
| | Técnica tradicional | Petrifilm | Rida Count | Coli ID | Técnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count | Coli ID | Técnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count | Coli ID |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

| | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|---------|---------|-------|-------------------------|--------|---------|--------|-------------------------------|-------|-------|--------|-------|
| Media | 3,11633 | 3,26267 | 3,642 | 3,45 | 5,3583 | 5,56633 | 5,4847 | 4,66033 | 3,269 | 2,986 | 3,222 | 3,184 |
| CV | 4% | 4% | 12% | 12% | 7% | 6% | 8% | 9% | 7% | 6% | 10% | 10% |
| Stand. dev | 0,1127 | 0,14635 | 0,447 | 0,4045 | 0,3739 | 0,34256 | 0,4352 | 0,40706 | 0,239 | 0,178 | 0,3388 | 0,309 |
| QUESO CAMPESINO | | | | CREMA DE LECHE 1 | | | | CARNE DE HAMBURGUESA 2 | | | | |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Media | 3,37733 | 3,53067 | 3,722 | 3,6137 | 2,286 | 2,324 | 2,2903 | 2,219 | 3,743 | 4,42 | 4,4653 | 4,276 |
| CV | 6% | 4% | 3% | 4% | 16% | 12% | 14% | 17% | 4% | 10% | 13% | 8% |
| Stand. dev | 0,19324 | 0,15039 | 0,105 | 0,1592 | 0,3627 | 0,26858 | 0,3286 | 0,37932 | 0,138 | 0,424 | 0,5997 | 0,362 |
| CUAJADA | | | | CREMA DE LECHE 2 | | | | CARNE DE HAMBURGUESA 3 | | | | |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Media | 4,46067 | 5,102 | 4,696 | 3,7517 | 3,306 | 3,644 | 3,5833 | 3,14933 | 2,226 | 2,38 | 2,1897 | 2,204 |
| CV | 11% | 8% | 6% | 18% | 6% | 4% | 9% | 6% | 9% | 10% | 8% | 10% |
| Stand. dev | 0,49026 | 0,40836 | 0,289 | 0,6638 | 0,2054 | 0,16211 | 0,3286 | 0,18585 | 0,209 | 0,244 | 0,1689 | 0,232 |

El parámetro de correlación (r) para *E.coli* obtenido a partir de las placas de Petrifilm *E.coli* y el método tradicional usando el agar Chromocult fue de 0.969, mientras que el obtenido con Rida Count fue de 0.926 y para Coli ID (Fig 21) fue de 0.882 de manera que si hay una correlación positiva entre el método tradicional y Petrifilm, lo mismo ocurre con Rida Count y Coli ID, existiendo una mejor correlación entre el método tradicional y Petrifilm en comparación con el método tradicional y Rida count.

Estos resultados se pueden comparar con otros estudios los cuales comparan Petrifilm y el método tradicional para el recuento de Coliformes y *E.coli* en aguas, donde se obtuvo como resultado recuentos de coliformes fecales y *E. coli* en las 177 muestras analizadas de 102 y 103 UFC / ml. El promedio en \log_{10} de los recuentos fue de 0.2, confirmando la presencia de coliformes fecales con las placas de Petrifilm EC, siendo este resultado inferior que utilizando el método tradicional con el agar MFC. El coeficiente de correlación entre los dos métodos fue 0.949 siendo este resultado mejor que los reportados en los estudios de comparación entre métodos de recuento en alimentos, los cuales oscilan entre 0,85 a 0,93 (Blackburn et al., 1996). Sin embargo, la prueba de t Student para datos apareados mostraron diferencias significativas entre los dos

procedimientos con una significancia del $P \leq 0.001$. El promedio de los recuentos \log_{10} se confirmó con las placas de Petrifilm EC *E. coli*, mostraron recuentos más bajos ($0,04 \log_{10}$) que utilizando el agar MFC. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa con la prueba "t" para datos apareados ($P = 0,126$). El coeficiente de correlación entre estos dos tipos de medios fue 0.879 concluyendo así, que las placas Petrifilm son más precisas y confiables para el recuento de *E.coli* en aguas. (Schraft*et al., 2005)

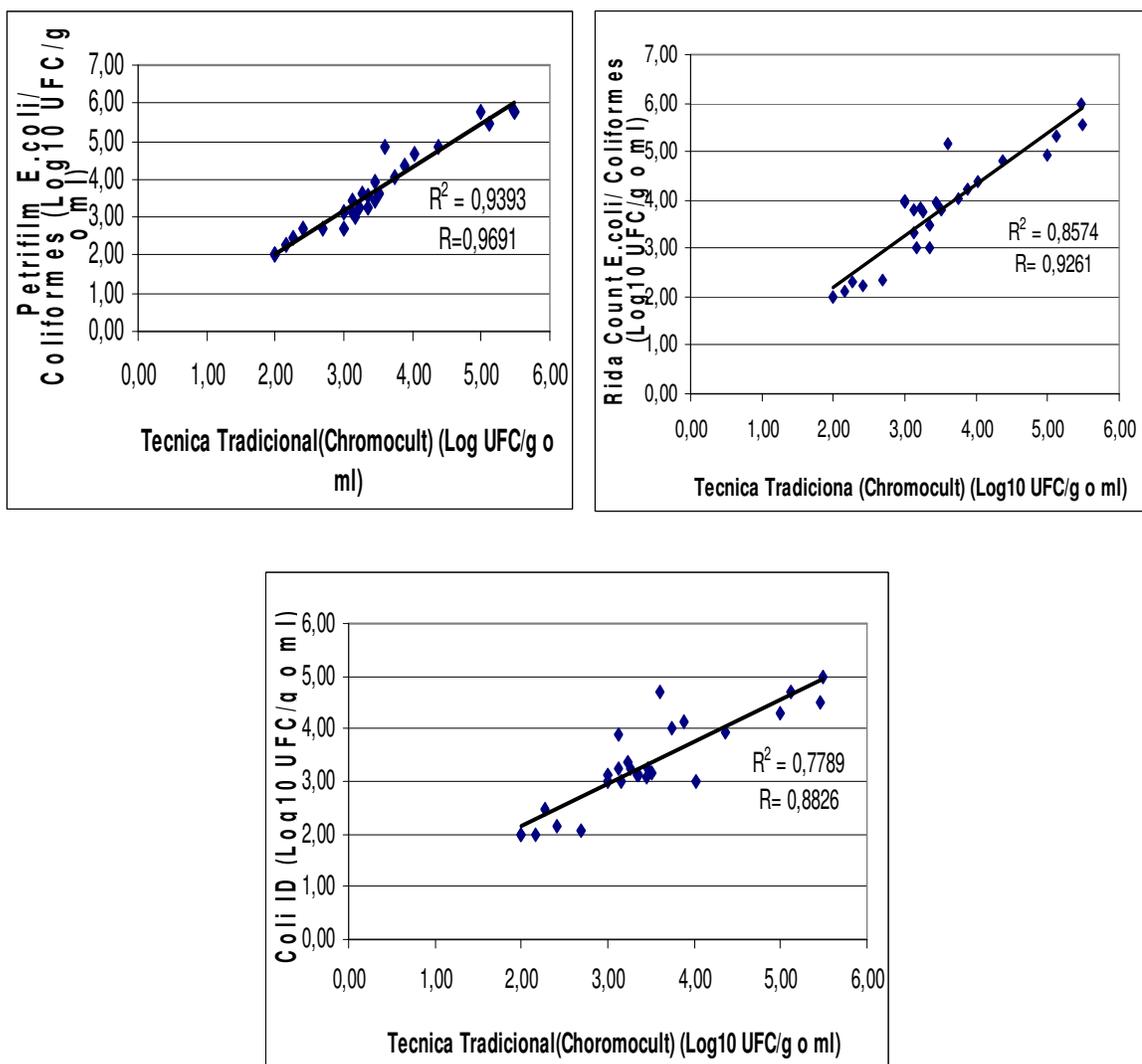


Figura 21. Coeficientes de correlación de los recuentos para la determinación de *E.coli* obtenidos con las Placas Petrifilm™, placas Rida Count y Coli ID a partir de 9 grupos de alimentos.

6.6.1.5 *S. aureus*:

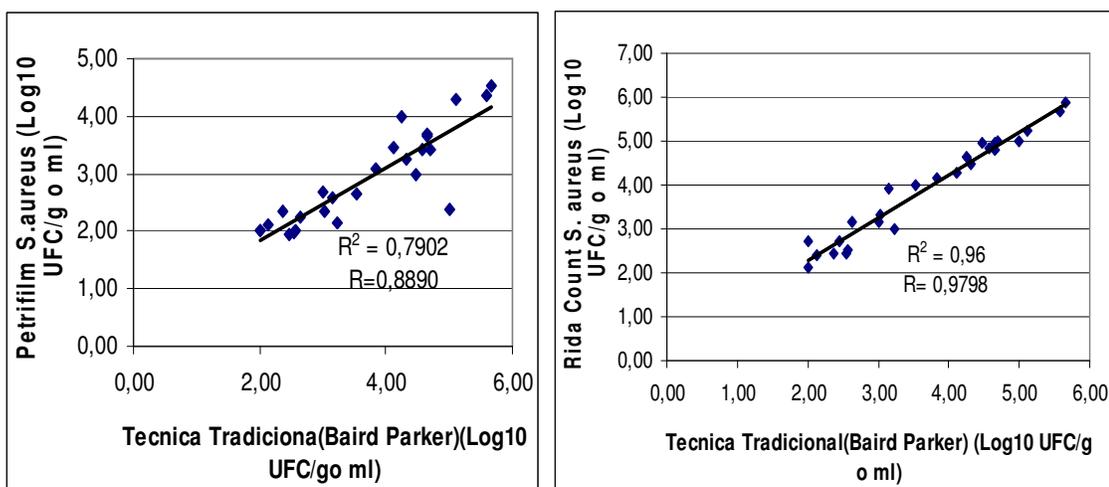
En la tabla 22 se puede observar el análisis estadístico de los recuentos realizados en cada una de las técnicas. El grado de concordancia entre los recuentos, se determinó con la desviación estándar y la media. Los resultados obtenidos con las tres repeticiones en cada una de las cuatro técnicas de recuento fueron menores del 10%, lo que muestra un alto grado de concordancia entre los datos. Encontrando que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas para las muestra: Leche pasteurizada ($P= 0.207$), queso campesino ($P= 0.076$), cuajada ($P= 0.123$), queso doble crema ($P= 0.196$), crema de leche 1($P= 0.143$), Crema de leche 2 ($P= 0.102$), carne de hamburguesa 1($P= 0.244$) carne de hamburguesa 2 ($P= 0.305$), carne de hamburguesa 3 ($P= 0.782$) con un nivel de significancia del 95%.

Tabla 22. Nivel promedio de *S.aureus* determinado por el método Tradicional, Placas Petrifilm, Placas Rida Count y Biomereux en las muestras en estudio.

| | LECHE PASTEURIZADA | | | | QUESO DOBLE CREMA | | | | CARNE DE HAMBURGUESA 1 | | | |
|-------------------|---------------------|-----------|------------|-----------|---------------------|-----------|------------|-----------|------------------------|-----------|------------|-----------|
| | Técnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count | Biomereux | Técnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count | Biomereux | Técnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count | Biomereux |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Media | 2,38867 | 1,571 | 2,34633 | 2,322 | 5,21933 | 4,79633 | 5,219 | 5,218 | 2,18667 | 2,25667 | 2,459 | 2,70867 |
| CV | 20% | 30% | 22% | 20% | 4% | 3% | 4% | 4% | 15% | 15% | 13% | 10% |
| Stand. dev | 0,498753 | 0,479862 | 0,521176 | 0,464116 | 0,2071 | 0,151803 | 0,183074 | 0,219779 | 0,323316 | 0,342065 | 0,310907 | 0,264863 |
| | QUESO CAMPESINO | | | | CREMA DE LECHE 1 | | | | CARNE DE HAMBURGUESA 2 | | | |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Media | 3,42333 | 3,00467 | 4,06067 | 3,81033 | 4,37633 | 3,75267 | 4,7 | 4,573 | 2,375 | 2,236 | 2,661 | 2,676 |
| CV | 14% | 15% | 11% | 9% | 12% | 18% | 5% | 6% | 8% | 5% | 16% | 14% |
| Stand. dev | 0,466661 | 0,465427 | 0,452001 | 0,352738 | 0,54015 | 0,671178 | 0,23205 | 0,295696 | 0,204572 | 0,11353 | 0,420046 | 0,378599 |
| | CUAJADA | | | | CREMA DE LECHE 2 | | | | CARNE DE HAMBURGUESA 3 | | | |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Media | 3,251 | 2,834 | 3,165 | 3,21633 | 4,52233 | 3,846 | 4,21733 | 4,397 | 4,51667 | 4,47367 | 4,70067 | 4,47 |
| CV | 8% | 6% | 5% | 7% | 8% | 7% | 8% | 6% | 4% | 6% | 4% | 4% |
| Stand. Dev | 0,262132 | 0,176034 | 0,157153 | 0,210771 | 0,356581 | 0,250462 | 0,328308 | 0,249866 | 0,179795 | 0,254137 | 0,205452 | 0,190568 |

El parámetro de correlación (r) para *S.aureus* obtenido a partir de las placas Petrifilm para *S .aureus* y el método tradicional usando el agar Baird Parker fue de 0.889, mientras que el obtenido con Rida Count (Fig 22) fue de 0. 9798 y el obtenido con Biomereux (Fig 12) fue de 0.95 lo cual indica que existe una alta correlación lineal directa entre ambas técnicas, existiendo una mejor correlación entre el método tradicional y Rida Count en comparación con el método tradicional y Petrifilm.

En otro estudio que se realizo para la evaluar Petrifilm Staph Express para el diagnóstico de mastitis causadas por *Staphylococcus aureus*, se utilizaron 4 muestras de leche. En uno de los experimentos se determino la prevalencia y sensibilidad relativa en función de diferente métodos microbiológicos como: centrifugación, incubación y Petrifilm, donde Petrifilm obtuvo mayor sensibilidad con un nivel de significancia del 95% y se obtuvo una prevalencia de *Staphylococcus aureus* del 86% en las 4 muestras de leche, en comparación con las muestras procesadas con el método estándar.(Silva et al., 2005)



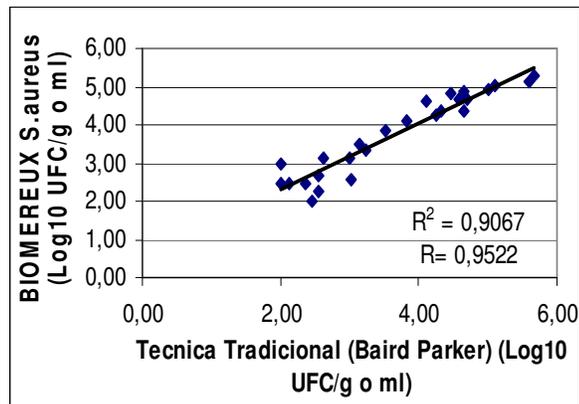


Figura 22. Coeficientes de correlación de los recuentos para la determinación de *S.aureus* obtenidos con las Placas Petrifilm 3M, placas Rida Count y Biomereux, apartir de 9 grupos de alimentos.

6.6.1.6 Hongos y levaduras:

En la tabla 23 se muestra los niveles promedio de hongos y levaduras, desviación estándar y el coeficiente de variación obtenidos a partir de las tres diferentes técnicas de recuento en las 9 muestras de alimentos. Con respecto al grado de concordancia entre los recuentos, que se determinó con la desviación estándar y la media, los resultados obtenidos con las tres repeticiones para cada una de las tres técnicas de recuento, fueron en su mayoría menores del 10% CV, lo que muestra un alto grado de concordancia entre los datos.; lo que sugiere que las técnicas de recuento son reproducibles, confiables y precisas para el recuento de hongos y levaduras. Encontrando que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas para cada muestra: Leche pasteurizada ($P= 0.161$), queso campesino ($P= 0.366$), cuajada ($P= 0.070$), queso doble crema ($P= 0.324$), crema de leche 1 ($P= 0.122$), Crema de leche 2 ($P= 0.277$), carne de hamburguesa 1 ($P= 0.794$), carne de hamburguesa 2 ($P= 0.591$), carne de hamburguesa 3 ($P= 0.562$) con un nivel de significancia de 95%.

Tabla 23. Nivel promedio de Hongos y levaduras determinado por el método Tradicional, Placas Petrifilm™ y Placas Rida count en las muestras en estudio.

| | LECHE PASTEURIZADA | | | QUESO DOBLE CREMA0 | | | CARNE DE HAMBURGUESA 1 | | |
|-------------------|---------------------|-----------|------------|---------------------|-----------|------------|------------------------|-----------|------------|
| | Tecnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count | Tecnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count | Tecnica Tradicional | Petrifilm | Rida Count |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Media | 4,621 | 4,95 | 4,7417 | 4,3647 | 4,741 | 4,59033 | 5,29233 | 5,642 | 5,16933 |
| CV | 5% | 4% | 4% | 7% | 5% | 5% | 21% | 10% | 12% |
| Stand. dev | 0,2268 | 0,185 | 0,1781 | 0,2891 | 0,221 | 0,22429 | 1,13884 | 0,57546 | 0,60019 |
| | QUESO CAMPESINO | | | CREMA DE LECHE 1 | | | CARNE DE HAMBURGUESA 2 | | |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Media | 4,544 | 4,908 | 4,7177 | 4,518 | 5,034 | 4,86033 | 5,652 | 5,93567 | 5,59733 |
| CV | 7% | 7% | 5% | 8% | 5% | 5% | 7% | 7% | 7% |
| Stand. dev | 0,3248 | 0,368 | 0,247 | 0,3441 | 0,274 | 0,24321 | 0,37071 | 0,44665 | 0,41586 |
| | CUAJADA | | | CREMA DE LECHE 2 | | | CARNE DE HAMBURGUESA 3 | | |
| N | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Media | 4,1827 | 4,503 | 4,2543 | 4,4667 | 4,734 | 4,69367 | 3,07667 | 3,19333 | 3,638 |
| CV | 4% | 3% | 3% | 6% | 5% | 5% | 18% | 16% | 13% |
| Stand. dev | 0,1659 | 0,138 | 0,114 | 0,2558 | 0,223 | 0,2419 | 0,49426 | 0,51712 | 0,46918 |

El parámetro de correlación (r) para Hongos y levaduras obtenido a partir de las Placas Petrifilm™ y el método tradicional usando el agar Saboreaud fue de 0.9760, mientras que el obtenido con Rida Count (Fig 23) fue de 0.968 de manera que si hay una correlación positiva entre el método tradicional y Petrifilm, lo mismo ocurre con Rida Count, existiendo una mejor correlación entre el método tradicional y Petrifilm. En un estudio donde se compara Las placas Petrifilm con los métodos tradicionales (ACC, VRBA, Levine EMB y agar agar OGYE) para la enumeración de bacterias aerobias mesófilas, coliformes, *Escherichia coli*, levaduras y mohos en seis lotes homogéneos de distintos grupos de alimentos (leche pasteurizada, yogur helados, huevos, carne picada, fresas frescas y congeladas judías verdes). Para todos los criterios microbiológicos aplicables a excepción de las levaduras y mohos y bacterias aerobias mesófilas en judías verdes congeladas, los valores medios obtenidos con placas Petrifilm fueron superiores a los obtenidos con los métodos tradicionales. El coeficiente de

correlación de Petrifilm para bacterias aeróbicas, coliformes, levaduras y mohos vs los medios de cultivo ACC, VRBA y OGYE para los seis grupos de alimentos fueron de 0,897, 0,861 y 0,981, respectivamente. Concluyendo que hay una correlación positiva entre las técnicas para el recuento de microorganismos en alimentos. (Jordano et al., 1995)

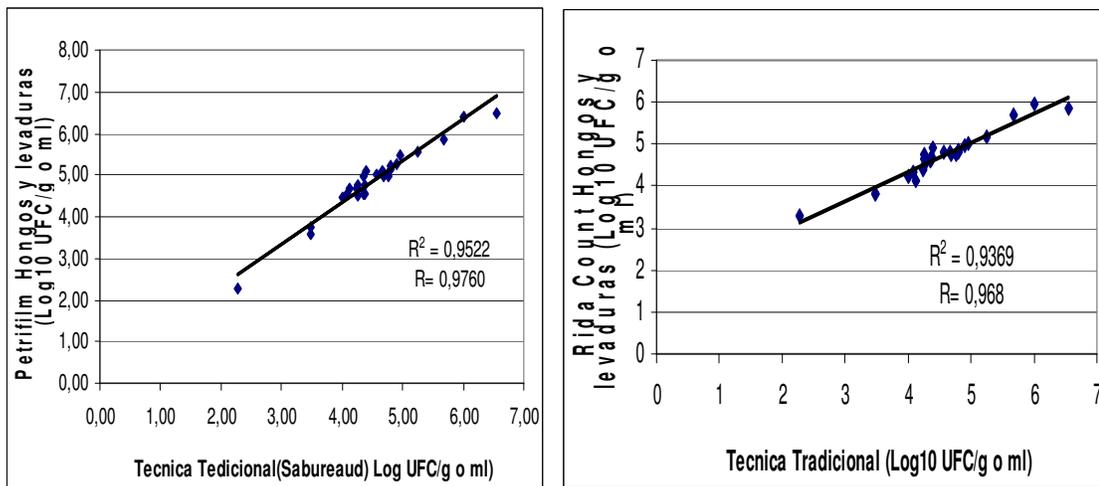


Figura 23. Coeficientes de correlación de los recuentos para la determinación de Hongos y levaduras obtenidos con las Placas Petrifilm™ y placas Rida Count a partir de los 9 grupos de alimentos.

6.7 DETECCIÓN DE *LISTERIA* EN SUPERFICIES

El objetivo de este análisis, fué determinar la selectividad de la Placas Petrifilm™ para monitoreo de *Listeria* en ambientes, los resultados observados a partir de las superficies contaminadas artificialmente con el pool que contenía *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* y *E. coli*, permitieron determinar que estos microorganismos no actúan como interferentes, ya que se observa claramente el desarrollo único de colonias características de *Listeria*. En los dos montajes realizados se tuvo que prolongar el tiempo de incubación, ya que entre las 28 y 30 horas no se observaron colonias claras, a excepción de los dos controles positivo empleados en el primer montaje, donde en uno de los controles la placa

tomo una coloración rojiza y en el otro se observaron colonias medianas de color rojizo. (Fig 25 y Fig 26).

En el primer análisis realizado, se empleó como hidratante caldo Letheen, lo cual posiblemente pudo interferir en los resultados observados, ya que el inserto aconseja el uso de agua peptonada bufferada para realizar la reparación de células lesionadas o estresadas; Sin embargo, también se avala el uso de caldo letheen en superficies que puedan presentar restos de agentes de limpieza, ya que este actúa como neutralizante de estas sustancias. Al día siguiente al realizar de nuevo la lectura de las placas se observó en la superficie contaminada N°6 la aparición unas pocas colonias de color rojo intenso, las cuales presuntivamente por su apariencia macroscópica pertenece al género *Listeria*.

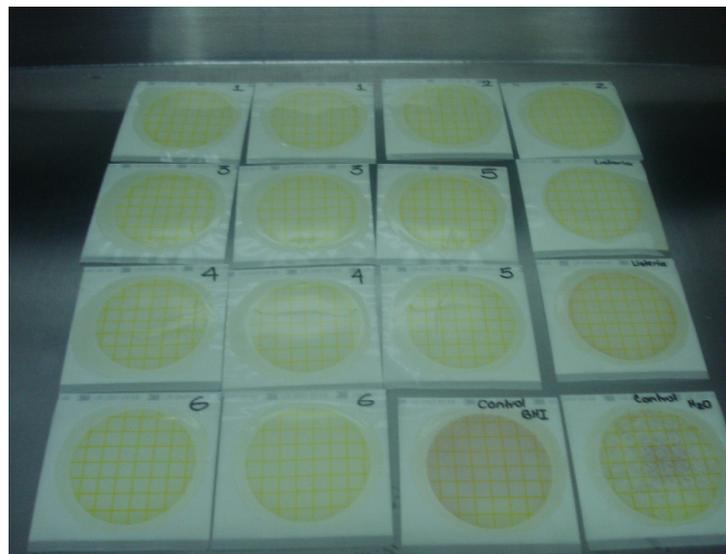


Figura 24. Placa Petrifilm para la detección de *Listeria* en ambientes.
Fuente: Autor

En el segundo montaje se reemplazó el caldo letheen y se empleó como diluyente agua peptonada bufferada, adicionalmente, se le realizaron diluciones al pool de bacterias en caldo BHI, se sembraron 3 ml en las placas partiendo de la dilución 10^{-3} y 10^{-5} , después de 28 horas de incubación se observó la aparición

de colonias redondas de un color rojizo tenue, lo cual hizo que las placas se incubaran por un tiempo adicional, posteriormente a esto, se observaron colonias redondas, delimitadas, de un color rojo-violeta intenso correspondientes a *Listeria*. Factores tales como el tipo de cepa, la naturaleza y el grado de estrés al que pueden haberse sometido los microorganismos, influyen en la velocidad a la cual el indicador cromogénico vira a un color rojo-violeta intenso.

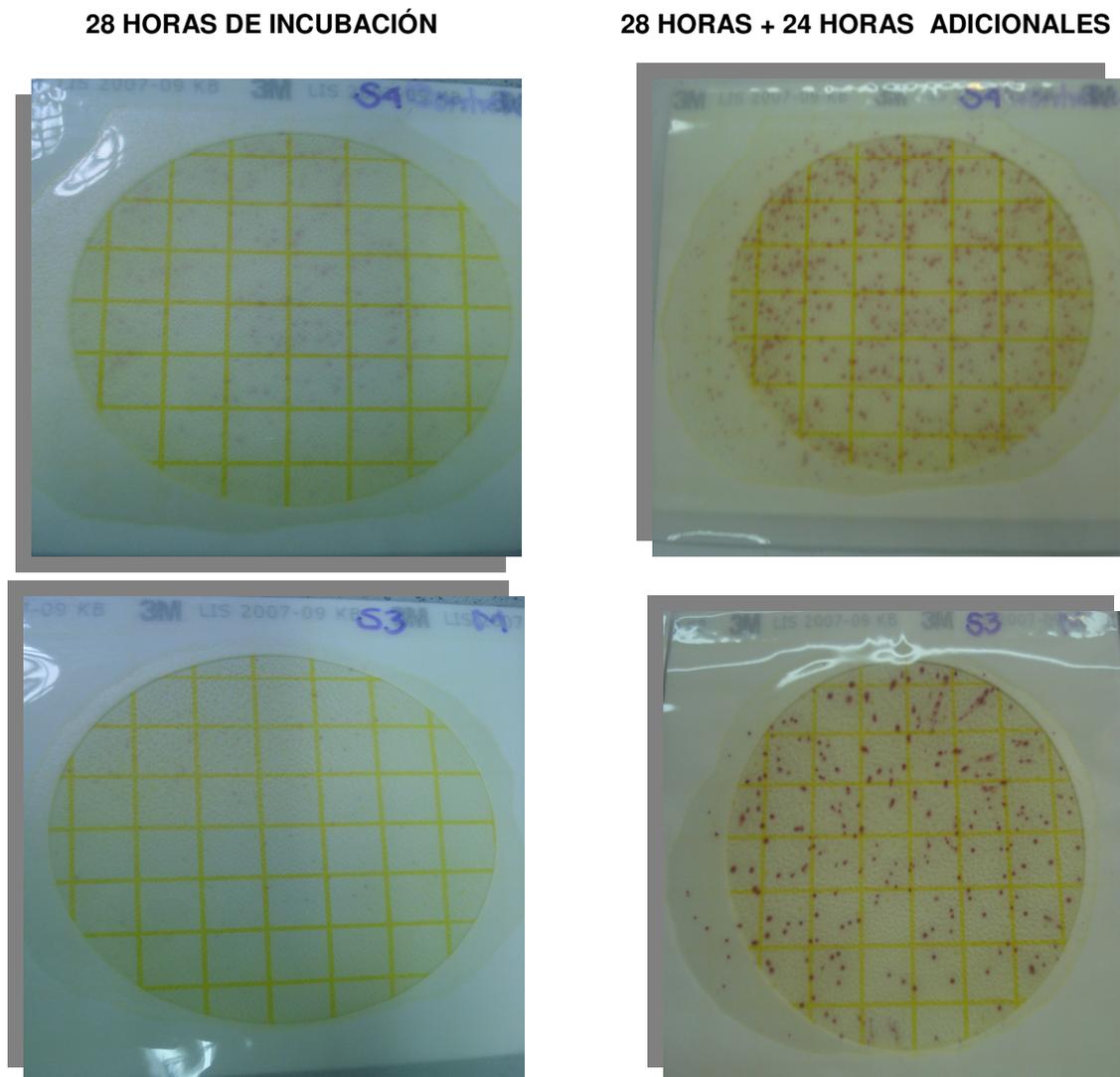


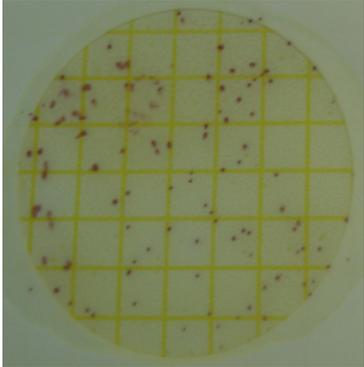
Figura 25. Placas Petrifilm™ en la detección de *Listeria* en superficie, durante 28 horas de incubación y 24 horas adicionales.

Fuente: Autor

En ninguno de los casos, se observó interferencia alguna de los microorganismos presentes en el pool.

En el ensayo realizado se observó claramente como se puede realizar tres tipos de interpretación de las placas Petrifilm: cuantitativo, semi cuantitativo y cualitativo.

TABLA 24. Interpretación cuantitativa y semi cuantitativa de las Placas Petrifilm™ para monitoreo de *Listeria* en ambientes.

| INTERPRETACIÓN | IMAGEN |
|--|---|
| <p>CUANTITATIVA: Colonias de <i>Listeria</i> estimadas en esta placa 90.</p> <p>SEMI CUANTITATIVA: El nivel de <i>Listeria</i> debe de registrarse en forma de niveles o categorías establecidos para la zona de muestreo y requerimientos de la planta. Por ejemplo, bajo, medio, alto o aceptable, no-aceptable.</p> <p>CUALITATIVA: Presencia de <i>Listeria</i>.</p> |  |

6.8 Ventajas y desventajas entre las técnicas de recuento.

TABLA 25. Ventajas y desventajas entre las técnicas de recuento rápido estudiadas

| Técnica tradicional | |
|---|--|
| Ventajas | Desventajas |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Los medios son de rápida solidificación siempre y cuando se preparen adecuadamente. ▪ La presencia de colonias en la superficie del medio de cultivo, permite con más facilidad obtener colonias representativas para realizar las pruebas bioquímicas, como en el caso <i>E.coli</i> y <i>S.aureus</i>. ▪ Se puede evidenciar fácilmente la contaminación del medio posterior a su inoculación, por la aparición de colonias de aspecto diferente. ▪ Los medios contienen indicadores químicos que colorean las colonias facilitando su recuento. ▪ La presencia de indicadores químicos y otras sustancias generan alta selectividad en el medio. ▪ Se puede observar la actividad | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Se requiere de un tiempo prolongado para la preparación de los medios de cultivo. ▪ Exceso o escasez de los medios de cultivo en el momento de su pesaje. ▪ Uso de agua corriente para la elaboración de los medios de cultivo. ▪ Uso inadecuado del volumen de agua destilada para la elaboración de los medios de cultivo, produciendo cambios de los componentes del medio. En el recuento de colonias se puede obtener recuentos erróneos. ▪ Los medios preparados son más susceptibles a cambios de pH y a la desecación. ▪ Existe riesgo de contaminación de los medios de cultivo, previo a su |

| | |
|--|---|
| <p>metabólica de los microorganismos, por viraje de color del medio, aspecto de las colonias, etc.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Existe gran variedad de medios presentes en el mercado para todos los sectores de la industria. ▪ En el Agar Chromocult por ser un medio granulado en el momento de su preparación sus partículas son menos volátiles, evitando ser molesto para el microbiólogo ya que reduce la manipulación de suplementos tóxicos. ▪ Las colonias son más vistosas. ▪ Algunos medios una vez autoclavados pueden almacenarse en la nevera y reconstituirse al momento de su uso. ▪ El envase de plástico permite conservar el producto fuera de la nevera. ▪ Los medios contienen agentes higroscópicos, que permiten que no sean alterados en lugares que son muy húmedos. ▪ Larga vida útil de los medios deshidratados conservados en condiciones adecuadas. ▪ Los medios deshidratados permite | <p>uso.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Una vez fundido el medio se debe mantener en baño María o incubadora a $45 \pm 1^\circ\text{C}$, controlando la temperatura con un termómetro para poder ser vertido en las cajas y evitar someter la muestra a un shock térmico. ▪ Poca estabilidad del agar ▪ Algunos de estos medios de cultivo son muy viscosos y no permiten su fácil distribución en las cajas de petri. ▪ Al momento de preparar los medios se puede exceder el tiempo y de temperatura del autoclave. ▪ En los medios con azúcares (glucosa, lactosa) un excesivo calentamiento lleva a caramelización, detectada por un oscurecimiento del color del medio ▪ Los medios de cultivo con el VRB son de difícil disolución. ▪ Algunos medios tienen que ser empleados inmediatamente después del autoclavado, ya que no se pueden reconstruir. ▪ La mala homogenización del medio con la muestra dificulta el |
|--|---|

| | |
|---|---|
| <p>preparar gran cantidad de medio.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ La distribución en los gránulos de los diferentes componentes de la fórmula hace que el medio sea mucho más homogéneo. Su estabilidad y conservación mejoran considerablemente respecto de los medios en polvo. | <p>recuento de las colonias, ya que aparecen manchas en las cajas.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ruptura del agar al momento de la homogenización de la muestra con las espátulas. ▪ Se pueden generar recuentos erróneos, ya que por ejemplo, en las cajas de recuento bacteriano pueden crecer algunas levaduras que si no se tiene la capacidad para diferenciarlas pueden estar generando recuentos equivocados, al ser contadas como bacterias. ▪ La técnica de NMP es una técnica semi – cuantitativa, que no brinda una exactitud de la población bacteriana presente en la muestra. ▪ Se requiere un tiempo adicional para marcar las cajas con el nombre y fecha de elaboración del medio, además de su almacenamiento en neveras. ▪ En algunos análisis se requieren pruebas confirmativas y por ende la preparación de material adicional. ▪ Uso excesivo de material de vidrio ▪ Reposición de material de vidrio roto. |
|---|---|

| | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mal estado del material de vidrio puede dificultar la lectura. ▪ Requiere mayor gasto de energía ▪ Proporciona resultados en tiempos mas prolongados de tiempo con relación a las otras técnicas |
|---|---|
| PETRIFILM | |
| Ventajas | Desventajas |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ No hay necesidad de preparar medio de cultivo. ▪ No hay necesidad de homogenizar. ▪ No hay necesidad de esterilizar ni de fundir los medios de cultivo. ▪ Altamente selectivos genera una mayor precisión en la obtención de los resultados. En las Placas Petrifilm sólo crecen el tipo de microorganismo indicador que se está evaluando. ▪ Estas placas ocupan menos espacio en la incubadora que las cajas de petri. ▪ Disponibilidad de la placa Petrifilm para la identificación simultanea de <i>E. coli</i> y coliformes. ▪ En el caso de las placas <i>E .coli</i> / | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Se necesita un dispersor diferente para cada una de las placas. ▪ Se debe tener cuidado al momento de dispersar la muestra para evitar que se derrame. ▪ Se generan burbujas de aire al momento de dejar caer el film superior ▪ La placa de mesófilos en muchas ocasiones no permite diferenciar colonias claras y dificulta la interpretación. ▪ Las placas de <i>S. aureus</i> y <i>Listeria</i> necesitan mayor tiempo de incubación de lo recomendado para observar con claridad los resultados. ▪ Es necesario ajustar el pH de algunas muestras antes de su |

| | |
|---|--|
| <p>coliformes se puede evidenciar la producción de gas a partir de la fermentación de la lactosa por medio de burbujas alrededor de la colonia, lo cual nos permite identificarlas más fácilmente de otros microorganismos que puedan crecer en este medio.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ La placa de Mohos y Levaduras posee dos antibióticos que inhiben completamente el crecimiento de bacterias eliminando los recuentos equivocados que se pueden generar al contar colonias de bacterias por colonias de levaduras. ▪ Se reducen los riegos de error, que se generan al momento de preparar un medio de cultivo. ▪ Reducción de tiempo y mano de obra, lo cual se traduce en aprovechamiento del personal en actividades complementarias que permitan mejorar los procesos y garantizar los estándares de calidad. ▪ Las placas de <i>S.aureus</i> son las únicas que necesitan disco para la confirmación de colonias. ▪ El tiempo en la obtención de | <p>inoculación.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Las placas son costosas. |
|---|--|

resultados es menor, pasamos para bacterias, de 48 a 72 horas con Técnica tradicional a 24 – 48 horas y para Hongos y Levaduras de 5-8 días a 3-5 días.

- Existe una mejor recuperación bacteriana ya que no se somete la muestra a choque térmico haciendo que los recuentos sean más precisos y confiables.
- Se pueden conservar mayor tiempo las placas de Petrifilm inoculadas sin ser contaminadas; en comparación a los medios de cultivo preparados, ya que quedan expuestas a otros microorganismos.
- Elimina por completo la exudación que se genera en las cajas de petri, por el metabolismo propio de los microorganismos
- Mejor recuento de colonias puntiformes, mejorando la calidad del análisis.
- Liberación rápida y oportuna de lotes de alimentos para su comercialización y distribución.
- Cada paquete viene acompañada de un certificado de conformidad y de una ficha técnica que permite

| <p>obtener una información clara sobre su uso, interpretación, etc.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Calidad estandarizada, solo se pueden generar errores por causa del analista ▪ Menor volumen de desperdicio ▪ Disminuye el uso de equipos como autoclaves, material de vidrio, neveras. | |
|---|--|
| Rida Count | |
| Ventajas | Desventajas |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ No requiere uso de dispersor de la muestra. ▪ No necesita de preparación de medio de cultivo, lo cual representa ahorro de tiempo. ▪ Fácil uso y tiene múltiples aplicaciones. ▪ Proporciona resultados en corto tiempo. ▪ Ocupa menos espacio en la incubadora, lo cual permite procesar mayor número de muestras sin que existan problemas de almacenamiento. ▪ Las placas inoculadas permanecen más tiempo sin ser afectadas por otros microorganismos. | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Algunos productos no se dispersan fácilmente, sobre todo aquellas muestras que son viscosas. ▪ Formación de burbujas entre el film superior e inferior, lo cual puede provocar una deshidratación en ese sector de la placa y por ende inhibición del crecimiento. ▪ Si no se cuenta con destreza puede resultar engorrosa la manipulación de las placas, ya que los film se encuentran adheridos entre si. ▪ Algunas muestras requieren diluciones adicionales para que actúe el indicador que permitirá |

| | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Las placas no se deshidratan tan fácilmente como los medios preparados. ▪ Elimina por completo la exudación que se genera en las cajas de petri, por el metabolismo propio de los microorganismos. ▪ Hay mayor recuperación de bacterias que utilizando medios de cultivo en polvo y granulado debido a que no se somete la muestra choque térmico. ▪ Cada placa tiene un código de color que permite diferenciarlas fácilmente. ▪ Tienen una vida útil larga bajo adecuadas condiciones de almacenamiento. ▪ Pueden ser empleadas en lectores de placas ▪ Vienen acompañadas de un inserto que funciona como modelo gráfico para la interpretación de las colonias. ▪ Se requiere menos de material de vidrio ▪ Se reduce el número de desperdicios. ▪ Se ahorra espacio en las incubadoras y neveras. | <p>observar colonias productoras de ácido y gas.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Algunas muestras no son absorbidas totalmente y se sale la muestra por los lados. ▪ Las placas de <i>S.aureus</i> necesitan mayor tiempo de incubación que la recomendada. (puede variar entre 48 a 72 horas). ▪ Leve color de las colonias dificulta la interpretación de Coliformes y <i>S. aureus</i> ▪ En las placas de <i>E. coli</i>/coliformes se dificulta su lectura, cuando hay exagerada presencia de colonias, lo cual evita identificarlas por su color correctamente. ▪ En las placas de Rida Count algunos hongos pueden crecer. ▪ No especifica el rango de conteo para ningún método ▪ Las placas de Coliformes, <i>E. Coli</i>, <i>S. aureus</i> y <i>Salmonella</i> no son resultados confirmados. ▪ El material entrelazado dificulta recuperar las colonias para futuras pruebas y confirmación. ▪ No cuenta con fichas técnicas individuales que especifiquen claramente el aspecto de las |
|--|---|

| | |
|--|------------------------------------|
| ▪ Presencia de sustancias indicadoras. | colonias, rangos de recuento, etc. |
|--|------------------------------------|

7. CONCLUSIONES

- Se evaluaron detalladamente los productos y métodos vigentes en el mercado para el análisis microbiológico de alimentos, determinando así las ventajas y desventajas que tiene el uso de cada uno de ellos.
- Las Placas Petrifilm™ a comparación de las demás técnicas de recuento rápido cuenta con un gran número de aprobaciones otorgadas por diferentes países, posicionando a Petrifilm a nivel mundial para el análisis de muestras de alimentos, lo cual le otorga una mayor credibilidad y confianza ante los clientes finales.
- Las Placas Rida®count actualmente se están posicionando como una competencia directa para los demás productos comerciales presentes en el mercado, sin embargo no cuentan las suficientes aprobaciones y reconocimientos, lo cual se convierte en una desventaja competitiva, de igual manera la poca antigüedad hace que este producto aun no cuente aun con un buen reconocimiento del mercado.
- Se lograron determinar los gastos que demanda el análisis de una muestra determinada, concluyéndose, que la técnica tradicional representa actualmente la opción más económica en el mercado en términos de costos de insumos y reactivos, pero a su vez se constituye como la opción más costosa en lo que se refiere a mano de obra, espacio y tiempo de análisis.
- Las técnicas para recuento rápido presentes en el mercado permiten una reducción de costos en mano de obra, ya que se omiten pasos en el proceso

de análisis microbiológico, sin embargo, el costo de los productos es elevado en comparación con la técnica tradicional.

- Los esfuerzos de las empresas comercializadoras de los productos para el análisis rápido de alimentos deben estar enfocados, en persuadir al cliente en cuento a la ventaja que trae el ahorro de tiempo y de espacio.
- Los medios de cultivo cromogénicos (Chromocult) y el Coli ID son dos de las alternativas más costosas para la determinación de *E. coli*/Coliformes; Sin embargo, su acogida se debe a que estos medios evitan pasos de confirmación y reducción en tiempos de incubación. Igualmente la presencia de sustratos cromógenos hace más fácil la lectura.
- El agar Chromocult y el medio de cultivo Coli ID representan una opción más económica en comparación con las Placas Petrifilm™ y Rida®count, para la determinación de *E. Coli*/Coliformes en alimentos.
- El uso de métodos rápidos en el laboratorio otorga algunos beneficios como el ahorro de trabajo, tiempo, exactitud, precisión y consistencia de los resultados, ahorro de espacio y almacenamiento, fácil interpretación microbiológica y reducción en gastos generales de operación.
- Con el uso de Placas Petrifilm™ placas y Rida®count se eliminan posibles errores en la preparación de medios de cultivo tradicionales, lo cual reduce la variación en los resultados y genera una mayor exactitud y consistencia en los resultados.
- La matriz de planificación permitió determinar las principales necesidades del cliente en técnicas de recuento rápido, puntos de venta, metas y la situación actual del mercado.

- Se determinó que entre las necesidades del cliente se encuentra en la realización de actividades de capacitación y charlas por parte de los proveedores de sus productos para el recuento de microorganismos, así mismo es de su interés que estas capacitaciones estén orientadas al conocimiento de los productos nuevos en el mercado, información actualizada de los distribuidores, microorganismos con los que trabajan en los laboratorios, soporte técnico, ventajas que trae trabajar con alguna técnica determinada, ofertas y promociones de los productos, capacitación del personal.
- Actualmente el 100% de las empresas utilizan la técnica tradicional para el análisis microbiológico de alimentos.
- Se determinó que 37 empresas de las 75 empresas encuestadas recurren a técnicas rápidas solamente en situaciones de emergencia o cuando no disponen de la totalidad de los insumos que se requieren para el análisis tradicional.
- La técnica de recuento rápido más empleada en momentos de emergencia en las industrias de alimentos son las Placas Petrifilm™
- Las Placas Petrifilm™ constituyen una excelente opción para los analistas al momento de realizar el recuento de microorganismos indicadores en alimentos, ya que cuentan con un portafolio completo de productos adicionalmente son fáciles de usar y les proporciona ahorro en el tiempo de análisis.
- Los análisis microbiológicos realizados comúnmente en las empresas de alimentos son microorganismos mesófilos, Enterobacterias, Coliformes, *E.coli*, *S.aureus*, Hongos y levaduras. Sin embargo, dependiendo de las materias primas que se empleen, las empresas también realizan determinación de

microorganismos patógenos, lo cual se constituye en un punto clave para tener en cuenta, ya que la mayoría de estos análisis se realizando actualmente por métodos convencionales.

- Se evaluó la eficiencia de las Placas Petrifilm™, Rida®count, coli ID, Baird Parker de Biomerieux en comparación con la técnica tradicional para la identificación de microorganismos indicadores en la industria de alimentos. Concluyéndose que las técnicas rápidas estudiadas proporcionan resultados equivalentes a los obtenidos por los métodos tradicionales.
- Las técnicas rápidas estudiadas son reproducibles, confiables y precisas para el recuento de mesófilos, Enterobacterias, Coliformes totales, *E.coli*, *S.aureus* y Hongos y levaduras.
- Existe un alto grado de concordancia entre los diferentes ensayos realizados, lo que significa que entre las técnicas de recuento utilizadas existe una variación menor del 10%.
- No hay diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas estudiadas para cada muestra de alimento con un nivel de confianza del 95%
- El coeficiente de correlación estuvo siempre en un rango de (0.78-0.98), los cuales se compararon con otros estudios realizados en las cuales utilizaron las mismas técnicas de recuento de microorganismos en alimentos.
- Las Placas Petrifilm™ en la mayoría de los recuentos realizados obtuvieron una mejor correlación lineal con respecto a la técnica tradicional en comparación a su competencia.

- Se demostró la selectividad de las Placas Petrifilm™ para monitoreo de *Listeria* en ambientes.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas interlaboratorios que permita dar mayor confiabilidad a los resultados obtenidos.
- Realizar una matriz de costos que contemple la totalidad de los gastos que demanda el análisis microbiológico, de tal manera que los costos sean aun más reales.
- Realizar un estudio que permita determinar el uso de las Placas Petrifilm™ en otros sectores de la industria (farmacéutica, aguas, etc.) en los cuales pueden ser útiles estos productos para el recuento rápido de microorganismos.
- Realizar un estudio comparativo entre las Placas Petrifilm™ para la detección de *Listeria* y otras alternativas vigentes en el mercado.
- Trabajar concentraciones conocidas de cada uno de los microorganismos presentes en el pool elaborado para determinar la selectividad de la Placa Petrifilm para la detección de *Listeria*, de tal manera que los resultados sean más confiables.

9. REFERENCIAS

Adams, M.R, Moss M.O. 1997. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. España. PG 125-138

Anderson, M. Calderón, V. 1999. Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Editorial Díaz de Santos S.A. Segunda Edición. Pg 125-138

Alexopoulos, C. 1966. Introducción a la Micología. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Pg 199-218

Baumgartner, A., Grand, M., Simmen, A., Halvax, M., 1993. Quantitative analysis of E. coli in water-comparison of ECDagar and Petrifilmk. Mitt. Geb. Lebensm.unters. Hyg. 84, 382– 387.

Bell, C. y Kyriakides, A. 2000. Listeria: Una aproximación práctica al microorganismo y su control. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A pg 147-156

B. O. Silva, D. Z. Caraviello, A. C. Rodrigues, and P. L. Ruegg . Evaluation of Petrifilm for the Isolation of *Staphylococcus aureus* from Milk Simples. Department of Dairy Science, University of Wisconsin, Journal of Dairy Science Vol. 88, No. 8, 2005.

Borezee, E. 2000. OppA de *Listeria monocytogenes*, an Oligopeptide Binding protein required for Bacterial Growth at Low Temperature and Involved in Intracellular Survival. *Infection and Immunity*. 68: Pg: 7069-7077

Chasseignaux, E. Tquin, M.T. Ragimbeau, C. Saltvat, G Colin, P. Ermel, G. 2001. Molecular Epidemiology of *Listeria monocytogenes* Isolates Collected from the Environment, Raw meat and Raw Products in Two Poultry and Pork Processing Plant. *Journal of Applied Microbiology*. 91(5) Pg: 8888-899.

Doyle, M., Beuchot , L. and Montville, J. 1997. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. American Society for Microbiology Press. Washington D.Pg 65-72

Doyle, M., Beuchot , L. and Montville, J. 2001. Microbiología de los Alimentos. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A Pg: 87-161

Fenlon, R.D. Wilson, J. Donachie, W. 1996. The Incidence and level of *Listeria monocytogenes* Contamination of Food Sources at Primary Production and Initial Processing. *Journal of Applied Bacteriology*. . Pg. 641-650.

Franco, C. M. Quinto, E.J. Fente, C. Rodriguez, J.L, Dominguez, L. Cepeda, A. 1995. Determination of the Principal Sources of *Listeria* spp. Contamination in Poultry Meat and a Poultry Processing Plant. *Journal of Food Protection*. 58(12): Pg: 1320-1325

Frazier, W.C. y Westhoff. D.C. 1993. Microbiología de los Alimentos, Zaragoza: Acribia S.A.Pg 112-121

Gallego, M. Torres, O. Soto, Y. Duque, D. Benitez, C.2003. Determinación de portadores de *Listeria spp* en un Conglomerado Lechero de la Vereda Puente de Piedra del Municipio de Madrid (Cundinamarca, Colombia). UDCA Actualidad & Divulgación Científica. 6(1). Pg: 49-56

Hayes, P.R. 1993. Microbiología e Higiene de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. España. Pg 25-38

Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J., Williams, S. 2000. Bergeys Manual of Determinate Bacteriology. Phyladelphia, USA. Lippincott Williams E. Wilkins. Pg 787.

H. Schraft*, L.A. Watterworth. Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water: comparison of 3Mk Petrifilm plates with Standard plating procedures. Department of Biology, Lakehead University, Thunder Bay, ON, Canada P7B 5E1. Journal of Microbiological Methods 60 (2005) 335– 342.

Hudson, W.R. Mead, G.C. 1989. *Listeria* Contamination at a poultry Processing Plants. Letter Applied Microbiology. Pg. 211-214.

Ingham, S. C., Schaeller, N.P. 2001. Comparison of the Baird Parker agar and 3M Petrifilm rapid *S.aureus* count plate methods for detection and enumeration of *S. aureus* food microbiology. Pg. 581-587

International commission on Microbial specifications for Food, of the international Union of Biological Societes. (ICMSF) 1996. Microorganismos de los alimentos: Características de los patógenos microbianos. Editorial Zaragoza: Acribia S.A. Pg: 165-175.

International commission on Microbial specifications for Food, of the international Union of Biological Societies. (ICMSF). 2000. Microorganismos de los alimentos: su significado y métodos de enumeración. Segunda edición. Editorial Acribia S.A Zaragoza, España.

Jay, M. 2002. Microbiología Moderna de los alimentos. Editorial Acribia Zaragoza. Pg. 342-345.

Johansson, T 1998. Enhanced Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* from Foodstuffs and Food-processing Environments. International Journal of Food Microbiology. Pg. 77-85.

Johansson, T. Rantala, L. Palmu, L. Honkanene- Buzalski, T. 1999. Occurrence and Typing of *Listeria monocytogenes* Strain in Retail Vacuum-packed Fish Products and in a Production Plant. International Journal of Food Microbiology. Pg. 111-119.

Jordano R., López pez M.C., Rodr Rodríguez guez M.V., C Córdoba M.G., Medina L.M., M.J. rdoxa Barrios. 1995. 1995.- Comparison of Petrifilm method to conventional methods for enumerating aerobic bacteria, coliforms, *Escherichia coli* and yeasts and molds in foods. . Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica Hungarica, 42(3): 255 , 255-259.

Koneman, E. 1999. Diagnostico microbiológico y atlas color. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Pg. 185

Lunden, J.M. Autio, T.J. korkeala,H.J. 2002. Transfer of Persistent *Listeria monocytogenes* Contamination Between Food Processing Plant Associated with a Dicing Machine. Journal of Food Protection Pg: 1129-1133.

Madigan, M. Martinko, J. Parker, J. 2004. Brock, Biología de los microorganismos. Decima Edicion. Editorial Pearson education, S.A. Madrid Pg.927-929.

McBride, M.E. and Girard, K.F. 1960. A selective method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 55: 153-157

Moltz Ag. Matin Se. 2005 Formation of Biofilms by *Listeria monocytogenes* under Various Growth Conditions. Journal of Food Protection: Vol. 68, No. 1 pp. 92–97

Mossel, D.2003. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia Zaragoza Pg 52-98

Nesbakken, T. Kapperud, G. Caugant, D.1996. Pathways of *Listeria monocytogenes* Contamination in the Meat Processing Industry. Internacional Journal of Food Microbiology. Pg. 161-171.

Nuñez de Gonzales, M. Keeton, J. Acuff, G. Ringer, L. Lucia, L. 2004. Effectiveness of Acidic Calcium Sulfate with Propionic and Lactic Acid and Lactates as Postprocessing Dipping Solution To Control *Listeria monocytogenes* on Frankfurters with or without Potassium Lactate and Vacuum Packaged at 4.5 °C. Journal of Food Protection. 67 (5): Pg. 915-921.

Padilla, J. 2007. Validación secundaria del método de recuento en placa en superficie de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos en un laboratorio de referencia. Tesis de pegrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Departamento de Microbiología. Bogota, Colombia. 84 p.

Pascual, M. Calderon, V.1999. Microbiologia Alimentaria. Editorial Diaz de Santos. Madrid.Pg. 171-208

Paula Tavoraro; Analí Ramazotti Ferrati; Maria Teresa Destro; Mariza Landgraf; Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco. Performance of two ready-to-use systems for enumeration of aerobic mesophilic microorganisms in frozen goat milk. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. Brazilian Journal of Microbiology (2005) 36:295-300.

Perdomo, H. Casanova O.N. Ciganda V.S. 2001. Contaminación de agua subterránea con nitrato y coliformes en el litoral sudeste de Uruguay. Agrocienca. Vol 5. N°1. Pg:10-22

Prescott, L. Harley, J. Klein, D. 1999. Microbiología. Cuarta Edición. Mac Graw Hill. Pg.129

Reid, C., Avery, S, Hutchison, M.,Buncic. 2002. Evaluation of sampling methods to asses the microbial status of cattle hides. Food Control. 13: 405-410

Ribeiro, M. Razalamahaleo, M. Cappelier, J. Besnar, V. Fedirighi, M. Leir, F.2005. Effect of Salting and Cold- Smoking Process on tha Culturation, Viability, and Virulence of *Listeria monocogenes* Strai Scott A. Journal of Food Protection. 68 (1).Pg 85-91.

Romejo, M. 2005. Validación secundaria del método de siembra en placa profunda para mesofilos aerobios, hongos y levaduras y ausencia presencia para *Salmonella sp* en muestras de alimentos bajo el contexto de la norma ISO NTC 17025. *Tesis de pregrado.* Pontificia Universidad Javeriana.

Sánchez, F. Mata, V. Espinoza, A. Villareal, L. 2006. Incidencia de las especies de *Listeria* en una planta de alimentos congelados. Ciencia UANL. Vol IX. N°1

Schofield, G.M.1992. Emerging Food-borne Pathogens and their Sinificance in Chilled Foods. Journal of Applied Bacteriology. Pg: 267-273.

Tortora, G. 1993. Introducción a la Microbiología. Editorial Acribia Zaragoza. España. Pg 35-47

Unnerstad, H. Bannerman, E. Bille, J Danielsson- Tahm, M.L. Waak, E. Tham, W.1996. Prolonged Contamination of a Dairy with *Listeria monocytogenes*. Neth Milk Dairy. Pg: 493-499

Vanegas, M. Maryinez, A. Medrano, M. 2006. Caracterización molecular de cepas toxigenicas de *Staphylococci* aisladas de operarios de plantas de alimentos. Asociación Colombiana de Infectología. Vol 10. Pg: 167- 174

RECURSOS ELECTRONICOS

Association Francaise de Normalisation. (AFNOR). 2008. [En línea]
<<http://www.afnor.org/portail.asp> > [Consulta:14 Julio 2008. Hora 4:30 p.m]

American Public Health Association (APHA). 2008. [En línea].<
<http://www.apha.org/> > [Consulta:14 Julio 2008. Hora 3 p.m]

Association of Official Agricultural Chemists. (AOAC). 2008 [En línea].
< <http://www.aoac.org/> > [Consulta: Julio 12 2008. Hora 8 p.m]

Biblioteca virtual en salud OPS / OMS Uruguay. Generalidades *Escherichia coli* [En línea].< www.bvsops.org.uy/pdf/coli.pdf > [Consulta:14 Enero 2008. Hora 3 p.m]

R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany.2006. [En línea].< <http://www.sincer.com.tr/microb/R1001-R1009%20TKB%20RIDA%20COUNT%20englisch%2006-06-19.pdf> > [Consulta:14 Enero 2008. Hora 3 p.m]

Chisso Corp., Microbiology. 2006. Evaluation of the Sanita-kun Coliforms, a Dehydrated Medium Sheet for Coliform Detection: Performance-Tested MethodSM 100402 [En línea].< www.atypon-link.com/AOAC/doi/abs/10.5555/jaoi.89.2.399> [Consulta:22 noviembre 2008 . Hora 4 p.m]

Chisso Corp., Microbiology. 2008. [En línea].< <http://www.chisso.co/index.asp> > [Consulta:12 Septiembre 2008. Hora 3 p.m]

Food and Drug Administration (FDA). 2008. [En línea].< <http://www.fda.gov/>> [Consulta: Mayo 15 2008. Hora 3 p.m]

Food Safety and Inspection Service (FSIS).2008. [En línea].< <http://www.fsis.usda.gov/>> [Consulta: 14 Julio 2008. Hora 3 p.m]

Instituto Nacional Colombiana de Normas Técnicas y Certificaciones. (ICONTEC). 2008. [En línea].< <http://www.icontec.org.co/>> [Consulta: 14 Julio 2008. Hora 3 p.m]

Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). 2008. [En línea]. < www.invima.gov.co/> [Consulta: 14 Julio 2008. Hora 5 p.m]

Laboratorio Central del Grupo Analiza Calidad. Método de rutina para el recuento de microorganismos. Método de recuento de las colonias a 30° C [En línea].< www.analizacalidad.com> [Consulta: 25 Febrero 2008. Hora 7 p.m]

Micronoticias. 3M Microbiología. 2006. Placas Petrifilm para el Recuento de Aerobio. [En línea].< <ftp://ftp.mmm.com/pub/MX/MicronoticiasJulio2006.pdf>> [Consulta: 13 de junio 2008 Hora: 6:28 p.m]

3M Microbiología. 2005.Placas 3M™ Petrifilm™ de Recuento Rápido de Coliformes. [En línea]. < http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/es_ES/food-safety/microbiology/products/online-catalog/?PC_7_RJH9U5230GE3E02LECIE208KC1_nid=GS7CZ6298TbeJQGNQ93JBSgl > [Consulta: 14 de enero 2008 Hora: 11: a.m].

3M Microbiología.2005. Placas 3M™ Petrifilm™ de Recuento de Enterobacteriáceas. [En línea].< http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/es_ES/food-safety/microbiology/products/online-catalog/?PC_7_RJH9U5230GE3E02LECIE208KC1_nid=GSMPSNZQ4YbeJQGNQ93JBSgl >_. [Consulta: 13 junio 2008 Hora: 7:02 p.m].

3M Microbiología.2005 Placa Petrifilm para Enterobacterias caja c/50 placas de 3M(MR). [En línea]. < http://www3.3m.com/catalog/mx/es003/healthcare/-/node_GSYKX4F5S6gs/root_LWWC5GZSGWgv/vroot_VS645F3J10ge/bgel_SFX_LJZ1DPJbl/gvel_W6GCDR6PVRgl/theme_mx_es_healthcare_3_0/command_LongDescOutlinkHandler/output_html>[Consulta: 13 junio 2008 Hora: 7:02 p.m].

3M Microbiología.2005. Petrifilm™ Sistema de Recuento Staph Express. [En línea]. <

<http://multimedia.mmm.com/mws/mediawebserver.dyn?6666660Zjcf6IVs6EVs66SCFnCOrrrrQ-> [Consulta: 14 enero de 2008 Hora: 11:47 a.m].

3M Microbiología. 2005. Placa Petrifilm para el monitoreo de *Listeria* en ambientes. [En línea].

<<http://multimedia.mmm.com/mws/mediawebserver.dyn?6666660Zjcf6IVs6EVs66SCfeCOrrrrQ->> [Consulta: 14 enero 2008 Hora: 12:15 a.m].

Micronoticias. 3M Microbiología.2000. ¿Que es un Método AOAC?. [En línea].

< <ftp://ftp.mmm.com/pub/MX/Micro4.pdf> > [Consulta:10 Julio 2008 Hora: 12:15 a.m].

Oteo, J. Alos, J. 2006. Listeria Y LISTERIOSIS. Servicio de Microbiología. Hospital de Móstoles. Móstoles, Madrid. [En línea]

<www.seimc.org/control/revi_bacte/listeria.htm>. [Consulta: Enero 14 de 2008]

United States of Agriculture. (USDA). 2008. [En línea]. < <http://www.usda.gov/> > [Consulta:18 Julio 2008 Hora: 12:05 a.m].

10. ANEXOS

ANEXO 1.



ENCUESTA TECNICAS DE RECuento PARA MICROORGANISMOS INDICADORES EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS

Encuestado: _____ Empresa: _____ Fecha: ____/____/____

1. Dispone usted de un laboratorio interno para procesar las muestras? SI_____ NO_____
2. Cuáles análisis microbiológicos realiza usted habitualmente, en que cantidad y con que frecuencia los realiza?
 - Mesófilos
 - Enterobacterias
 - Coliformes
 - *E. coli*
 - *S. aureus*
 - *Listeria sp*
 - Hongos y Levaduras
 - Otros, Cuales?
3. Qué técnica emplea usted actualmente para el análisis de las muestras?
4. ¿Qué tipo de método prefiere usted emplear para la detección de microorganismos?

- a. Recuento en Placa
- b. Pruebas enzimáticos
- c. Métodos químicos: bioluminiscencia – sustratos fluorogenos y cromogénicos
- d. Otro. ¿Cual? _____

| |
|--|
| |
| |
| |
| |

5. Califique de 1 a 5 según el grado de importancia que tienen para usted los siguientes parámetros al momento de escoger un método para la identificación de microorganismos:

- a. Costo
- b. Prestigio del método
- c. Resultados confiables
- d. Reducción de tiempo
- e. Presentación del producto, empaque

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

6. ¿Qué espera principalmente de la casa comercial que distribuye el producto de recuento de microorganismos?

- a. Que ofrezca actividades de capacitación, charlas y eventos.
¿Qué temas le gustaría conocer? _____
- b. Que ofrezca promociones.
- c. Que tenga algún reconocimiento de calidad en el mercado.
- d. Que le proporcione soporte técnico

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| | | | | |

7. Califique de 1 a 5 la importancia que tiene para usted que su método este respaldado por las siguientes aprobaciones y

regulaciones:

- a. AOAC-OMA
- b. AOAC-RI
- c. AFNOR
- d. FDA
- e. FSIS
- f. ICONTEC
- g. INVIMA
- h. APHA
- i. USDA

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

8. A nivel técnico usted califique de 1 a 5 la importancia que tienen los siguientes parámetros al momento de llevar a cabo el análisis microbiológico de una muestra:

- a. Tiempo de incubación y análisis
- b. Lectura fácil
- c. Resultados confiables
- d. Mano de obra
- e. Inversión en espacios y equipos

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

9. ¿Qué espera usted principalmente del método que emplea para el análisis microbiológico?

a. Que le garantice confiabilidad, productividad y eficiencia

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|

b. Que le genere una reducción de costos y ahorro de tiempo

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|

c. Que le proporcione resultados precisos y reproducibles

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|

d. Que se ajuste a las regulaciones nacionales e internacionales

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|

ANEXO 2

DECRETO 616 DE 2006

(Febrero 28)

Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercialice, expendi, importe o exporte en el país.

CAPITULO V

Especificaciones técnicas de la leche

Características microbiológicas de la leche pasteurizada

| Índices permisibles | n | m | M | C |
|--|---|------------|-------|---|
| Rto. Microorganismos mesófilos ufc/ ml | 3 | 40000 | 80000 | 1 |
| Rto. Coliformes ufc/ml | 3 | Menor de 1 | 10 | 1 |
| Rto. Coliformes fecales ufc/ml | 3 | Menor de 1 | - | 0 |
| Recuento de mohos, y levaduras ufc/g | 3 | 100 | 500 | 1 |
| Recuento de Staphylococcus aureus coagulasa positivo ufc/g | 3 | <100 | 100 | 1 |
| Recuento Bacillus cereus ufc/g | 3 | 100 | 100 0 | 1 |
| Detección de Salmonella/25g | 3 | 0 | - | 0 |

Cuando se utilice la técnica de número más probable NMP para coliformes totales y fecales se informará menor de tres.

NMP = número más probable (se recomienda utilizar la técnica de NMP debido a que esta técnica se utiliza más para productos con baja carga microbiana.

n = número de muestras que se van a examinar

m = índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad

M = índice máximo permisible para identificar nivel de calidad aceptable

C = número de muestras permitidas con resulta de entre m y M

< = léase menor de

RESOLUCIÓN NUMERO 02310 DE 1986

(24 de Febrero de 1986)

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

ARTICULO 28. De las características de la crema de leche.

| Indices permisibles | n | m | M | C |
|---|----------|------------|----------|----------|
| NMP Coliformes totales/g | 3 | 75 | 120 | 1 |
| Coliformes fecales /g | 3 | <3 | - | 0 |
| Rto. Coliformes fecales ufc/ml | 3 | Menor de 1 | - | 0 |
| Recuento de mohos, y levaduras ufc/g | 3 | 100 | 200 | 1 |
| Recuento de Staphylococcus aureus coagulasa positivo ufc/g | 3 | 100 | 200 | 1 |
| Recuento Bacillus cereus ufc/g | 3 | 100 | 100 0 | 1 |
| Detección de Salmonella/25 g | 3 | 0 | - | 0 |

ARTICULO 42. De las clases de queso.

| Indices permisibles | n | m | M | C |
|---|---|------------|------|---|
| NMP Coliformes fecales /g | 3 | <3 | - | 0 |
| Detección de Salmonella/25g | 3 | 0 | — | 0 |
| Rto. Coliformes fecales ufc/ml | 3 | Menor de 1 | - | 0 |
| Recuento de mohos, y levaduras ufc/g | 3 | 100 | 200 | 1 |
| Recuento de Staphylococcus aureus coagulasa positivo ufc/g | 3 | 1000 | 3000 | 1 |

NTC 1325: Productos cárnicos procesados no enlatados.

| Indices permisibles | n | m | M | C |
|---|---|--------|--------|---|
| Rto. Microorganismos mesófilos ufc/ g | 3 | 200000 | 300000 | 1 |
| NMP Coliformes totales /g | 3 | 120 | 1100 | 1 |
| Recuento de esporas Clostridium sulfito reductor, UFC/g | 3 | 100 | 1000 | 1 |
| NMP Coliformes Fecales/g | 3 | <3 | - | - |
| Recuento de Staphylococcus aureus coagulasa positivo ufc/g | 3 | <100 | 100 | 1 |
| Detección de Listeria monocytogenes, /25g | 3 | 0 | - | - |
| Detección de Salmonella/25g | 3 | 0 | — | - |

ANEXO 3.

Fundamento de los productos comerciales

| Técnica | Tiempo de Incubación | Principio | Materiales | Interpretación |
|---------------------------|--|---|---|--|
| Método tradicional | <ul style="list-style-type: none"> • 24-48 horas (bacterias) • 5 días (hongos y levaduras) | <p>Recuento en placa de microorganismos que crecen en sustrato elaborado en el laboratorio, seguido en algunos casos por pruebas de identificación.</p> | <p>Balanza Fascos de dilución Pipetas Rastrillos Cajas de petri Medios específicos Diluyente Homogenizador Autoclave Fioles Probetas Incubadora</p> | <p>Colonias de aspecto característico o turbidez</p> |
| Petrifilm 3M | <ul style="list-style-type: none"> • 24-48 horas (bacterias) • 3-5 días (hongos y levaduras) | <p>Película rehidratable cubierta con nutrientes y agentes gelificantes. Proporciona resultados en tres pasos: inoculación, incubación y recuento en placa.</p> | <p>Balanza Fascos de dilución Diluyente Homogenizador Incubadora Pipetas</p> | <p>Colonias de color específico, producción de gas</p> |
| Ridacount | <ul style="list-style-type: none"> • 24-48 horas (bacterias) • 3-5 días (hongos y levaduras) | <p>Prueba de lámina con medio listas para usar, diseñadas para la detección cuantitativa de microorganismos en alimentos y</p> | <p>Balanza Fascos de dilución Diluyente Homogenizador Incubadora</p> | <p>Colonias de color específico</p> |

| | | | | |
|--------------------------------------|--|--|---|--|
| | | ambientes que consisten en una película deshidratada de medios generales o selectivos, posee una cubierta transparente que evita la contaminación indeseada. | Pipetas | |
| Agar Baird parker - Biomeraux | | Medio de cultivo preparado para el recuento sin confirmación de <i>Estafilococcus coagulasa</i> positivo. | Balanza Fascos de dilución Pipetas Diluyente Homogenizador Incubadora | Colinas pequeñas, puntiformes, de color negro |
| Agar TBX - Sharlau | <ul style="list-style-type: none"> • 24 horas | Medio de cultivo cromogenico selectivo para la enumeración de <i>Escherichia coli</i> . | Balanza Fascos de dilución Pipetas Diluyente Homogenizador Incubadora | Colonias verde oscuro |
| Agar Chromocult Merck | <ul style="list-style-type: none"> • 24 horas | Medio selectivo para la detección simultanea de coliformes totales y <i>E. coli</i> . | Balanza Fascos de dilución Pipetas Diluyente Homogenizador Incubadora | <i>E. coli</i> : Colonias de color azul oscuro a violeta (reacción salmón GAL y X-glucuronido) Coliformes: Colonias color salmón a rojo (Reacción salmón GAL) |
| Coli ID - Biomeraux | <ul style="list-style-type: none"> • 24 horas | Medio cromogenico selectivo para la detección y recuento de <i>E.coli</i> β -D-glucuronidasa positivo y coliformes a 44 °C | Balanza Fascos de dilución Pipetas Diluyente Homogenizador Baño termostatado | <i>E. coli</i> : Colonias color azul – violeta Coliformes: Colonias color rojo |

ANEXO 4 Resultados de los recuentos (Log UFC/ ml o g) en las técnicas de recuento rápido y la Técnica Tradicional

TABLA 1. Recuentos de Mesófilos aerobios (Log UFC/ml o g) en las tres técnicas de Recuento.

| MUESTRA | TECNICA TRADICIONAL | | | PETRIFILM | | | RIDA COUNT | | |
|------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|
| | (LogUFC/ml o g) | | | (LogUFC/g o ml) | | | (LogUFC/g o ml) | | |
| | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 |
| LECHE | 4,755 | 4,328 | 5,396 | 4,361 | 4,455 | 5,098 | 4,783 | 4,061 | 5,075 |
| QUESO CAMPESINO | 4,041 | 4,189 | 4,659 | 4,041 | 4,261 | 4,872 | 4,063 | 3,955 | 4,647 |
| CUAJADA | 4,755 | 3,379 | 4,65 | 4,822 | 3,504 | 4,752 | 4,53 | 3,155 | 4,712 |
| QUESO CREMA | 4,361 | 3,061 | 4,26 | 4,401 | 3,15 | 4,69 | 4,181 | 3,056 | 4,58 |
| CREMA DE LECHE 1 | 3,579 | 3,115 | 3,016 | 3,807 | 3,372 | 3,18 | 3,475 | 3,336 | 3,08 |
| CREMA DE LECHE 2 | 4,477 | 4,399 | 4,662 | 4,698 | 4,396 | 4,46 | 4,459 | 4,251 | 4,13 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 1 | 3,23 | 4,678 | 3,161 | 3,591 | 4,568 | 3,33 | 3,502 | 4,636 | 3,26 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 2 | 4,477 | 4,261 | 4,451 | 4,872 | 4,486 | 4,586 | 4,322 | 4,312 | 4,654 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 3 | 4,361 | 3,079 | 5,963 | 4,204 | 3,304 | 5,999 | 4,642 | 3,298 | 5,867 |

TABLA 2. Recuentos de Enterobacterias (Log UFC/ml o g) en las tres técnicas de Recuento.

| MUESTRA | TECNICA TRADICIONAL | | | PETRIFILM | | | RIDA COUNT | | |
|------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|
| | (LogUFC/ml o g) | | | (LogUFC/g o ml) | | | (LogUFC/g o ml) | | |
| | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 |
| LECHE | 4,146 | 4,368 | 4,123 | 4,361 | 4,398 | 4,149 | 4,113 | 4,268 | 4,162 |
| QUESO CAMPESINO | 3 | 4,562 | 3,663 | 3,556 | 4,684 | 4,368 | 3,204 | 4,682 | 4,122 |
| CUAJADA | 4,851 | 4,863 | 4,625 | 4,146 | 4,965 | 4,763 | 4,278 | 4,867 | 4,314 |
| QUESO CREMA | 3,991 | 4,015 | 3,861 | 3,995 | 4,896 | 4,162 | 3,982 | 4,768 | 4,121 |
| CREMA DE LECHE 1 | 3,414 | 3,512 | 3,325 | 3,959 | 3,613 | 3,624 | 4,342 | 3,524 | 3,454 |
| CREMA DE LECHE 2 | 5,322 | 5,463 | 5,425 | 5,356 | 5,568 | 5,637 | 5,219 | 5,121 | 5,017 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 1 | 3,146 | 3,244 | 3,125 | 3,38 | 3,458 | 3,452 | 3,204 | 3,124 | 3,362 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 2 | 5,041 | 5,322 | 5,256 | 5,23 | 5,425 | 4,369 | 5,134 | 5,361 | 4,024 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 3 | 5,397 | 5,486 | 5,385 | 5,447 | 5,628 | 5,429 | 5,447 | 5,467 | 5,325 |

TABLA 3. Recuento de Coliformes (Log UFC/ ml o g) en las tres técnicas de recuento

| MUESTRA | TECNICA TRADICIONAL | | | PETRIFILM | | | RIDA COUNT | | |
|--------------------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|
| | (LogUFC/ml o g) | | | (LogUFC/g o ml) | | | (LogUFC/g o ml) | | |
| | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 |
| T A LECHE | 2,38 | 2,478 | 2,354 | 3,318 | 3,112 | 3,103 | 3,113 | 3,24 | 3,007 |
| B L QUESO CAMPESINO | 3,591 | 3,689 | 3,589 | 3,568 | 3,758 | 3,628 | 3,175 | 3,596 | 3,539 |
| A CUAJADA | 4,707 | 4,826 | 4,762 | 5,176 | 5,015 | 4,924 | 4,397 | 4,248 | 4,495 |
| 4 . QUESO CREMA | 3,799 | 3,964 | 3,569 | 4,707 | 4,024 | 4,038 | 4,178 | 3,691 | 3,874 |
| CREMA DE LECHE 1 | 3,568 | 3,679 | 3,546 | 3,579 | 3,781 | 3,639 | 3,986 | 3,678 | 3,553 |
| CREMA DE LECHE 2 | 3,963 | 4,12 | 3,845 | 3,986 | 3,895 | 3,899 | 3,782 | 3,747 | 3,752 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 1 | 3,176 | 3,458 | 3,245 | 3,079 | 3,685 | 3,478 | 3,366 | 3,511 | 3,421 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 2 | 6,342 | 5,689 | 5,321 | 5,832 | 5,758 | 5,475 | 4,929 | 4,981 | 4,764 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 3 | 5,204 | 5,439 | 5,125 | 5,38 | 5,689 | 5,248 | 4,431 | 4,985 | 4,651 |

TABLA 4. Recuento de *E. coli* (Log UFC/ Ml o g) en las cuatro técnicas de recuento

| MUESTRA | TECNICA TRADICIONAL | | | PETRIFILM | | | RIDA COUNT | | | COLI ID | | |
|------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|
| | (LogUFC/ml o g) | | | (LogUFC/g o ml) | | | (LogUFC/g o ml) | | | (LogUFC/g o ml) | | |
| | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 |
| LECHE | 3 | 3,124 | 3,225 | 3,113 | 3,128 | 3,247 | 4 | 3,785 | 3,841 | 3,107 | 3,896 | 3,347 |
| QUESO CAMPESINO | 3,518 | 3,457 | 3,257 | 3,633 | 3,458 | 3,601 | 3,806 | 3,904 | 3,756 | 3,146 | 3,237 | 3,258 |
| CUAJADA | 4,991 | 4,024 | 4,367 | 5,763 | 4,689 | 4,854 | 4,913 | 4,368 | 4,806 | 4,301 | 3,014 | 3,94 |
| QUESO CREMA | 5,462 | 5,489 | 5,124 | 5,857 | 5,785 | 5,457 | 5,968 | 5,562 | 5,324 | 4,505 | 4,987 | 4,689 |
| CREMA DE LECHE 1 | 3,447 | 3,124 | 3,347 | 3,934 | 3,424 | 3,574 | 3,954 | 3,328 | 3,468 | 3,079 | 3,245 | 3,124 |
| CREMA DE LECHE 2 | 2 | 2,164 | 2,694 | 2 | 2,247 | 2,725 | 2 | 2,124 | 2,347 | 2 | 2 | 2,057 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 1 | 3 | 3,158 | 3,348 | 2,695 | 3,015 | 3,248 | 3,954 | 3 | 3,012 | 3 | 3,012 | 3,14 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 2 | 3,604 | 3,879 | 3,745 | 4,869 | 4,364 | 4,027 | 5,146 | 4,235 | 4,015 | 4,689 | 4,125 | 4,014 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 3 | 2 | 2,412 | 2,267 | 2 | 2,672 | 2,467 | 2 | 2,245 | 2,324 | 2 | 2,156 | 2,457 |

TABLA 5. Recuento de *S. aureus* (Log UFC/ ml o g) en las tres técnicas de recuento.

| MUESTRA | TECNICA TRADICIONAL | | | PETRIFILM | | | RIDA COUNT | | | BIOMEREUX | | |
|------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|
| | (LogUFC/ml o g) | | | (LogUFC/g o ml) | | | (LogUFC/g o ml) | | | (LogUFC/g o ml) | | |
| | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 |
| LECHE | 2,361 | 2,458 | 2,547 | 1,877 | 1,947 | 1,989 | 2,778 | 2,714 | 2,447 | 2 | 2,012 | 2,254 |
| QUESO CAMPESINO | 3,832 | 3,523 | 3,15 | 3,101 | 2,635 | 2,578 | 4,162 | 4,012 | 3,908 | 4,112 | 3,851 | 3,468 |
| CUAJADA | 3 | 3,025 | 3,23 | 2,698 | 2,356 | 2,148 | 3,157 | 3,326 | 3,012 | 3,118 | 2,574 | 3,357 |
| QUESO CREMA | 5,113 | 5,587 | 5,658 | 4,301 | 4,364 | 4,524 | 5,223 | 5,665 | 5,869 | 5,041 | 5,149 | 5,264 |
| CREMA DE LECHE 1 | 5 | 4,658 | 4,471 | 2,369 | 3,689 | 3 | 4,986 | 4,967 | 4,947 | 4,903 | 4,889 | 4,827 |
| CREMA DE LECHE 2 | 4,698 | 4,257 | 4,12 | 3,414 | 3,981 | 3,457 | 4,995 | 4,657 | 4,266 | 4,685 | 4,268 | 4,638 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 1 | 2 | 2,56 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2,74 | 2,512 | 2,125 | 2,985 | 2,684 | 2,457 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 2 | 2,633 | 2,124 | 2,368 | 2,233 | 2,124 | 2,351 | 3,146 | 2,414 | 2,423 | 3,113 | 2,447 | 2,468 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 3 | 4,579 | 4,657 | 4,314 | 3,414 | 3,658 | 3,249 | 4,853 | 4,782 | 4,467 | 4,69 | 4,356 | 4,364 |

TABLA 6. Recuento de Hongos y levaduras (Log UFC/ ml o g) en las tres técnicas de recuento.

| MUESTRA | TECNICA TRADICIONAL | | | PETRIFILM | | | RIDA COUNT | | |
|------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------------|-----------|-----------|
| | (LogUFC/ml o g) | | | (LogUFC/g o ml) | | | (LogUFC/g o ml) | | |
| | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 |
| LECHE | 4,806 | 4,689 | 4,368 | 5,12 | 4,978 | 4,753 | 4,863 | 4,735 | 4,627 |
| QUESO CAMPESINO | 4,806 | 4,568 | 4,258 | 5,234 | 5 | 4,491 | 4,813 | 4,824 | 4,516 |
| CUAJADA | 4 | 4,241 | 4,124 | 4,463 | 4,657 | 4,689 | 4,255 | 4,368 | 4,14 |
| QUESO CREMA | 4,079 | 4,358 | 4,657 | 4,565 | 4,547 | 5,112 | 4,356 | 4,612 | 4,803 |
| CREMA DE LECHE 1 | 4,908 | 4,257 | 4,389 | 5,279 | 4,738 | 5,086 | 4,944 | 4,745 | 4,892 |
| CREMA DE LECHE 2 | 4,755 | 4,267 | 4,378 | 4,986 | 4,654 | 4,563 | 4,74 | 4,652 | 4,689 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 1 | 4,954 | 6,562 | 4,361 | 5,479 | 6,486 | 4,961 | 5 | 5,836 | 4,672 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 2 | 5,255 | 6,014 | 5,687 | 5,54 | 6,42 | 5,847 | 5,146 | 5,965 | 5,681 |
| CARNE DE HAMBURGUESA 3 | 3,477 | 2,275 | 3,478 | 3,586 | 2,254 | 3,74 | 3,819 | 3,281 | 3,814 |

ANEXO 5

MEDIOS DE CULTIVO

AGUA PEPTONADA

Diluyente utilizado para la homogenización de muestras alimentarias.

Composición (g/l)

Peptona 10,0

Cloruro sodico 5,0

Fosfato disodico 9,0

Fosfato dipotasico 1,5

PLATE COUNT

Medio de cultivo para el recuento microbiano en alimentos, agua y otros materiales.

Composición (g/l)

Peptona de caseina 5,0

Extracto de levadura 2,5

D(+) glucosa 10,0

Agar –agar 14,0

MAC CONKEY

Agar selectivo para el aislamiento de *Salmonellas*, *Shigellas* y bacterias coliformes, a partir de heces, orina, alimentos, aguas residuales.

Las sales biliares y el Violeta cristal inhiben considerablemente la flora gram-positiva. La lactosa, junto con el indicador de pH Rojo neutro, sirven para la comprobación de la degradación de dicho azúcar. Las colonias lactosa-negativas

son incoloras y las lactosa-positivas son rojas con un halo turbio debido al descenso de pH provocado por los ácidos biliares.

Composición (g/l)

Peptona de caseína 17,0
peptona de carne 3,0
cloruro sódico 5,0
lactosa 10,0
mezcla de sales biliares 1,5
Rojo neutro 0,03
Violeta cristal 0,001
Agar-agar 13,5

VRB

Agar selectivo para la demostración y enumeración de bacterias coliformes, especialmente Escherichia coli. El violeta cristal y las sales biliares inhiben el desarrollo de la flora acompañante gram positiva. La degradación de la lactosa a ácido por la E.coli se pone de manifiesto por el viraje al rojo del indicador Rojo Neutro. Las bacterias coliformes lactosa positivas incluyendo la Escherichia coli se manifiestan como colonias rojas rodeadas de un precipitado rojizo con un tamaño de 1 a 2 mm.

Composicion (g/l)

Peptona de cane
Extacto de levadura
CINa
Lactosa
Rojo neutro
Sales biliares
Cristal Viloleta

CALDO BILIS VERDE BRILLANTE

En este medio, selectivo y diferencial, la bilis y el verde brillante inhiben casi por completo una flora no deseada, en especial microorganismos gram positivos. La presencia de *E. coli* se evidencia por fluorescencia bajo la luz UV, reacción al indol positiva y presencia de gas en el tubo por la fermentación de lactosa.

Composicion (g/l)

Peptona 10,0

Lactosa 10,0

Bilis de buey desecada 20,0

Verde brillante 0.0133

4-metillumbelliferyl-B-D-glucorónido

l- triptofano

EMB (Agar-Eosina-Azul de metileno-lactosa-sacarosa)

El contenido en lactosa y sacarosa hacen posible la distinción de *Salmonellas* y de *Shigellas* lactosa-negativas y saca rosa-negativas, frente a la flora acompañante lactosa negativa pero saca rosa-positiva (por ejemplo, *Prvulgaris*, *Citrobacter*, *Aeromonos hydrophila*). Los gérmenes de acompañamiento indeseables, bacterias grampositivas especialmente, resultan ampliamente inhibidos en su crecimiento, gracias a los colorantes presentes en la formulación. Las placas se siembran finamente en superficie, por estría. Incubación: 24 horas a 35 °C aerobia.

Composición (g/l)

Peptona 10,0

hidrogenofosfato dipotásico 2,0

Lactosa 5,0

Sacarosa 5,0

Eosina amarillenta 0,4

Azul de metileno 0,07

Agar-agar 13,5.

AGAR SABURAUD CLORANFENICOL

Medio utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos. También es útil para el cultivo de levaduras. En el medio de cultivo, la Pluripeptona y la glucosa, son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, favorecen el crecimiento de hongos por sobre el de bacterias. Además, al medio de cultivo, pueden agregarse otros agentes selectivos de crecimiento.

Composición (g/l)

Peptona de caseína 5,0

Pluripeptona 5,0

D(+) glucosa 40,0

Cloranfenicol 0,5

Agar-agar 15,0

AGAR BASE BAIRD PARKER

El medio que es suplementado con telurito y yema de huevo es un medio selectivo para la detección y enumeración de *Staphylococcus aureus* cuagulasa positiva en contaminación de alimentos. El medio contiene piruvato y glicina que incrementa el desarrollo de *Staphylococcus*.

El telurito y la yema de huevo son los responsables de la diferenciación de *Staphylococcus aureus* cuagulasa positiva mediante la aparición de colonias de un halo transparente producido por lipólisis y proteólisis.

El desarrollo de *Proteus* y *Bacillus* puede desarrollarse y se distinguen por la formación de colonias oscuras e irregulares.

Composición (g/l)

Triptona 10,0

Piruvato de sodio 10,0

Glicina 12,0

Extracto de levadura 5,0

Cloruro de litio 5,0

Agar-agar 17,0

TBX (Triptona, Bilis, X-Glucuronido, Agar)

Medio cromogénico para realizar el recuento de E.coli en profundidad. La presencia de la enzima B-D- glucuronidasa diferencia a la mayoría de las especies de E.coli de otros coliformes.

E.coli absorbe el sustrato cromogenico 5-Br-4-Cl-3- indol-glucuronido (X-B-D glucuronido). De este modo, las colonias de E.coli son de color azul verdoso. El crecimiento de la microorganismos acompañantes Gram positivos es inhibido por el uso de sales biliares y la temperatura de incubación de 44°C.

Composición (g/l)

Triptona 20,0 g

Sales Biliares 1,5 g

X-Glu 0,075 g

Agar-Agar 14,0 g

CALDO TRIPTICASA SOYA

Medio de cultivo universal, sin sustancias indicadoras o inhibidoras, utilizable en un amplio espectro de aplicaciones. Puede soportar cultivos de microorganismos exigentes.

Composición (g/l)

Peptona de caseína (o digerido pancreático de caseína) 17.0g
Peptona de harina de soya (o digerido enzimático de soya) 3.0g
D(+)-Glucosa (o dextrosa) 2.5g;
Cloruro de sodio 5.0g
Fosfato dipotásico 2.5g

CALDO BHI (Caldo de corazon y cerebro)

Utilizado para la determinación de cuagulasa positiva de *S.aures*.

Composición (g/l)

Extracto de cerebro 7.8

Extracto de corazón 9,7

Peptona de proteasa 10,0

Dextrona 2,0

Cloruro sodico 5,0

Fosfato disodico 2,5

CALDO TRIPTONA

se emplea para la prueba de indol, la cual detecta la presencia de la enzima triptofanasa en las bacterias y nos permite distinguir *E. coli* (indol+) de los otros coliformes (indol-). Esta enzima degrada el aminoácido triptófano a indol, que es el compuesto que se detecta en este ensayo.

REACTIVO DE KOVACS

El reactivo de Kovacs contiene p-dimetilaminobenzaldehído, que puede reaccionar tanto con el indol como con el triptófano, produciendo compuestos de coloración rojiza. Para evitar la interferencia del triptófano, el p-dimetilaminobenzaldehído está disuelto en alcohol isoamílico inmiscible en agua. A diferencia del triptófano, el indol es soluble en alcohol isoamílico, y por tanto, sólo él reaccionará con el aldehído produciendo el anillo coloreado.



ESTUDIO COMPARATIVO EN TÉCNICAS DE RECUENTO RÁPIDO EN EL MERCADO Y PLACAS PETRIFILM™ 3M™ PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Lina Ximena Alonso Nore – Jeimy Alexandra Poveda Sánchez
Facultad de Ciencias – Pontificia Universidad Javeriana – Bogotá

RESÚMEN

En la actualidad las industrias de alimentos se ven en la necesidad de implementar metodologías para el análisis microbiológico que faciliten la obtención de resultados en un tiempo corto, que al mismo tiempo sean fiables, exactos, económicos y ayuden a agilizar los procesos de verificación de lotes de producción para asegurar al consumidor alimentos inocuos que no representen un peligro para la salud.

Para tal fin, en este estudio se realizó la comparación entre algunos de los productos (Placas Petrifilm 3M™, Placas RIDA@COUNT, Agar Chromocult, Coli ID, el medio preparado Baird Parker y la técnica tradicional) presentes actualmente en el mercado para el análisis microbiológico rápido a nivel comercial, técnico y de conocimiento de las regulaciones nacionales e internacionales.

Para llevar a cabo este estudio, se realizaron pruebas de laboratorio orientadas al análisis de muestras de alimentos (Leche pasteurizada, crema de leche, queso y carne de hamburguesa) empleando inicialmente la técnica tradicional como punto de referencia para hacer la comparación en términos de selectividad, resultados y desempeño con los productos de recuento rápido. Para conocer la competencia presente en el mercado,

las necesidades y preferencias de los consumidores, se aplicaron 75 encuestas a empresas procesadoras de alimentos y laboratorios de servicio. Adicionalmente se determinó el costo de cada técnica y se estudió cada una de las aprobaciones con las que cuenta cada producto.

El procedimiento realizado consistió en analizar las muestras empleando recuento en placa en profundidad de Mesófilos aerobios, Enterobacterias, Coliformes, *Escherichia coli* y Mohos/Levaduras y el recuento en superficie de *Staphylococcus aureus* de acuerdo con las metodologías descritas por las entidades de regulación nacional. Se realizaron controles positivos y negativos en cada uno de los análisis respectivamente. Para la detección de *Listeria* en superficies, se contaminaron artificialmente (12) doce superficies con un pool que contenía *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas*, con el fin de determinar la selectividad de la Placas Petrifilm 3M™ para *Listeria*. Con las encuestas realizadas se desarrolló una matriz de planificación que permitió identificar las necesidades y preferencias del cliente.

Con los resultados obtenidos, se determinó el coeficiente de correlación entre las técnicas en cuestión, lo cual permitió concluir que existe un alto grado de correlación lineal entre la técnica tradicional y las técnicas rápidas de

recuento presentes en el mercado. Por otra parte, se comprobó la selectividad de las Placas Petrifilm 3M™ para la detección de *Listeria* en ambientes. En lo que se refiere a costos, se determinó que la Técnica tradicional se presenta como la técnica más económica en términos de insumos, pero a la vez como la más costosa en términos de mano de obra, espacio y tiempo en comparación con las técnicas de recuento rápido.

Palabras claves: Placas Petrifilm 3M™, Rida®count, coli ID, mesófilos, *E. coli*, *S. aureus*, coliformes, *Listeria*, Hongos y levaduras.

INTRODUCCIÓN

El análisis microbiológico en la industria de alimentos se constituye en una herramienta básica para el control de materias primas, procesos y productos y manipuladores, ya que permite establecer el valor grado de contaminación biológica de estos, por esta razón el control microbiológico es parte fundamental en todo el proceso.

La mayor parte de los alimentos se convierten en potencialmente peligrosos solo después de que se han violado los principios de higiene, limpieza y desinfección. La puesta en evidencia de estos riesgos se basa en los métodos de examen microbiológico utilizados para controlar la calidad del alimento que son en si mismos muy variados y dependientes, en gran parte del alimento que va a ser analizado. Los métodos de análisis deben proporcionar las bases necesarias para poder emitir dictámenes sobre la calidad y seguridad microbiológica de los alimentos. Es por ello que antes de seleccionar un método para la detección de microorganismos, se debe conocer la sensibilidad y reproductibilidad. (Perdomo et al, 2001)

Ya que realizar un análisis microbiológico suele ser una tarea que consume gran

cantidad de tiempo y trabajo, se ha presentado la necesidad de desarrollar métodos rápidos y fáciles para cuantificar y detectar microorganismos, ya que en algunas ocasiones es necesario dar resultados rápidos, que permitan tomar decisiones lo más pronto posible, esto muchas veces no es posible, debido a que se debe esperar que los microorganismos crezcan en los medios de cultivo y lograr visualizar su presencia, siendo además muchos de ellos de crecimiento lento, los microorganismos de interés están presentes a menudo en cantidades muy pequeñas con respecto al resto de la microbiota acompañante, lo que implica un pre enriquecimiento previo en medios selectivos, finalmente, dependiendo del producto a analizar, es necesario realizar un previo tratamiento o purificación de los microorganismos, para evitar las interferencias de la matriz en la que estos se encuentran. (Holt et al., 2000)

Los métodos rápidos ofrecen la posibilidad de evitar algunos de estos pasos, con el ahorro de tiempo y trabajo. Pero no siempre se dispone de estos métodos y a veces demandan altos costos. Estos métodos son un conjunto de técnicas microbiológicas, bioquímicas, fisiológicas, inmunológicas y serológicas para el aislamiento más efectivo, la detección, caracterización y enumeración más rápida de microorganismos y sus productos en alimentos. Se puede decir que un método rápido es aquel que proporciona resultados en un tiempo menor al método convencional y que además es sencillo y confiable.

Actualmente en el mercado se encuentran disponibles diferentes productos para la detección rápida y efectiva de microorganismos indicadores en la industria de alimentos, entre ellos se encuentran las Placas Petrifilm 3M, que consisten en una familia de placas listas para usarse diseñadas para ofrecer ahorro de tiempo,

incremento de productividad, fiabilidad y eficiencia. Su diseño tiene una película rehidratable cubierta con nutrientes y agentes gelificantes. Proporciona resultados en tres pasos: inoculación, incubación y recuento. Las Placas Petrifilm 3M™ están disponibles para la mayoría de las necesidades de pruebas microbiológicas incluyendo: recuento de aerobios, recuento de coliformes, recuento de *E. Coli* / coliformes, recuento de Enterobacterias, recuento de alta sensibilidad de coliformes, recuento rápido de coliformes, recuento de *Staphylococcus aureus*, recuento de mohos y levaduras y *Listeria* en ambientes. (3M, 2006)

La placas de RIDA@COUNT representan otra alternativa para la detección cuantitativa de microorganismos en alimentos y ambientes; es una prueba de lámina con medio listas para usar, que consisten en una película deshidratada de medios generales o selectivos en las cuales se deposita 1 ml de muestra, la cual hidrata el medio, posee una cubierta transparente que evita la contaminación indeseada. Este producto está diseñado para el recuento de Mesófilos Aerobios, Coliformes totales, Enterobacterias, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella* y Hongos y levaduras. (Corporación Chisso, 2003).

Coli ID es un medio cromogénico selectivo para la detección y recuento de *E. Coli* β D glucuronidasa positivo a 44° C, y recuento simultáneo de *E. Coli* y otros coliformes a 37°C, a partir de muestras alimenticias. La combinación de sus dos sustratos cromogenicos optimiza la detección de *E. Coli* y coliformes.

El agar Chromocult es un medio selectivo para la detección simultánea de coliformes totales y *Escherichia coli* en agua potable y muestras alimentos procesados. El sustrato cromógeno contenido en Chromocult® da un color claramente distinguible a cada tipo de

colonia separada, permitiendo una clara identificación y evitando así errores de recuento.

MATERIALES Y METODOS

Lugar de estudio

Este estudio se desarrollo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, Colombia. 3M Microbiología suministro todo el material necesario para la realización del estudio.

MUESTRAS

Se analizaron nueve (9) muestras de alimentos (carne de hamburguesa, leche pasteurizada, crema de leche y queso) las cuales se adquirieron en diferentes supermercados del noroccidente de Bogotá. De cada alimento se emplearon tres muestras pertenecientes al mismo lote. Igualmente el análisis incluyo la evaluación de superficies para la detección de *Listeria*. El tamaño de muestra se determino por muestreo no probabilístico.

MICROORGANISMOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO

Se emplearon 5 géneros bacterianos (*E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *Listeria sp* y *Pseudomonas*) y un genero de hongos, los cuales sirvieron para realizar el control positivo de cada uno de los medios empleados. Las suspensiones se prepararon según el tubo N° 2 del patrón de Mac Farland para bacterias y el N° 3 para hongos y levaduras.

METODOS

Dilución y homogenización de las muestras: La muestra se agito manualmente, se verifico la integridad del recipiente que contenía las muestras, para

abrirlo posteriormente de forma aséptica. Se pesaron las muestras y se agregaron a frascos con agua peptonada al 0.1%. Posteriormente se agitaron manualmente. Se realizaron diluciones seriadas en base 10 (obteniendo así las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}).

Análisis Microbiológico de las nueve muestras de alimentos con las Técnicas de recuento utilizadas.

| Microorganismo | Técnicas | Medio | Temp | Time |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------|-------------------|
| | Placa profunda | Plate count | 35+/- 2°C | 48 h |
| Mesófilos | Petrifilm | Plate count | 35+/- 2°C | 48 h |
| | Rida count | Plate count | 35+/- 2°C | 24 h |
| | Placa profunda | MK | 35+/- 2°C | 48 h |
| Enterobacterias | Petrifilm | VRBG | 35+/- 2°C | 24 h |
| | Rida count | | 35+/- 2°C | 24 h |
| | Placa profunda | VRB | 35+/- 2°C | 48 h |
| Coliformes | NMP | Caldo Brilla | 35+/- 2°C | 24-48 h |
| | Petrifilm | VRBL | 35+/- 2°C | 24 h |
| | Rida count | VRB | 35+/- 2°C | 24 h |
| Escherichia coli | A/P | Caldo EC EMB MK | 35+/- 2°C | 18 h 24 h-48 h |
| | Placa profunda | Chormocult | 35+/- 2°C | 24 h |
| | Placa profunda | TBX | | 24 h |
| | Petrifilm | VRBL | 35+/- 2°C | 24 h |
| E. coli / Coliformes | Rida count | VRBA | 35+/- 2°C | 24 h |
| | Placa profunda | Coli ID | 44°C | 24 h |
| Staphylococcus aureus | Siembra en superficie | Baird parker | 37°C | 48h |
| | Petrifilm | Baird-Parker | 35+/- 2°C | 24 h |
| | Rida | Manitol | 35+/- | 24 h |

| | | | | |
|--------------------------|----------------|----------------------------|------------|----------|
| | count | salado Modificado | 2°C | |
| Mohos / Levaduras | Placa profunda | Saboreaud | 22°+/- 2°C | 5-7 días |
| | Petrifilm | Sabouroud + 2 Antibióticos | 22°+/- 2°C | 5-7 días |
| | Rida count | YGC modificado | 22°+/- 2°C | 5-7 días |
| Listeria sp | Petrifilm | | 37°C | 28 h |

Tabla 1. Análisis microbiológico para las muestras analizadas

Después de la incubación, fue importante observar las características macroscópicas de las colonias que crecieron en las Placas Petrifilm 3M™ y en las placas de RIDA@COUNT.

| Características de las colonias en las Placas Petrifilm 3M™ | |
|---|--|
| Tipo de Placa | Colonias |
| Placas Petrifilm Staph Express para Staph aureus | color azul-violeta y con el disco Staph Express colonias con zona rosada |
| Placas Petrifilm para Aerobios totales | color rojizo |
| Placas Petrifilm Coliformes | Color rojo con presencia de gas. |
| Placas Petrifilm para E.coli / Coliformes | color azul con presencia de gas |
| Placas Petrifilm para Mohos y Levaduras | color verdes-azul |
| Placas Petrifilm para Enterobacterias | Color rojo con presencia de gas (zonas amarillas). |
| Placas Petrifilm para monitoreo de Listeria en ambientes | color rojo |

Tabla 2. Características de las colonias en las Placas Petrifilm 3M™

| Características de las colonias en las Placas RIDA@COUNT | |
|--|----------------------|
| Tipo de Placa | Colonias |
| RIDA@COUNT Total | Color rojo |
| RIDA@COUNT Enterobacteriaceae | Color azul |
| RIDA@COUNT Coliformes | Color azul |
| RIDA@COUNT Yeast & Mold Rapid | Color azul-verde |
| RIDA@COUNT E. coli/Coliform | Color púrpura y azul |
| RIDA@COUNT Staph. aureus | Colonias azul-verdes |

Tabla 3. Características de las colonias en las Placas RIDA@COUNT

Para la Determinación de *Listeria* en superficies, primero se reconstituyó una cepa de *Listeria monocytogenes* en caldo BHI, se realizó un pool con *E. coli*, *Pseudomonas sp*, *Listeria monocytogenes* en un frasco shott que contenía 20ml de caldo BHI, luego se incubó durante 24 horas a 35 °C en agitación.

Se emplearon tabletas de baldosín y se autoclavaron, luego se contaminaron las superficies con el pool de bacterias y se dejó secar. Se tomó la muestra de la superficie utilizando un hisopo previamente humedecido en agua bufferada y caldo letheen y se depositó el hisopo dentro del tubo y se llevaron a incubar durante 1 hora a 37 °C

De estos tubos que fueron incubados, se tomaron 3 ml y se sembraron en las Placas Petrifilm 3M™ para monitoreo de ambientes y se llevaron a incubar durante 28 horas a 37 °C.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizó el reporte de los resultados de los recuentos para cada uno de los microorganismos según lo estipulado en la NTC 4092 de 1997. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa

estadístico PAST versión 1.53. Aplicando regresión lineal con el \log_{10} de los recuentos; se determinó el coeficiente de correlación permitió determinar el grado de concordancia de los datos obtenidos experimentalmente.

También se determinaron los niveles promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados obtenidos a partir de las tres o cuatro diferentes técnicas de recuento.

Mesófilos aerobios:

Se realizó la comparación entre las técnicas para el recuento de Mesófilos aerobios por la prueba de ANOVA, calculando el valor de P, se concluyó que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas para cada muestra, debido a que el valor de $P > 0.05$, obteniendo para la leche pasteurizada ($P = 0.867$), queso campesino ($P = 0.862$), cuajada ($P = 0.939$), queso doble crema ($P = 0.976$), crema de leche 1 ($P = 0.647$), Crema de leche 2 ($P = 0.178$), carne de hamburguesa 1 ($P = 0.971$), carne de hamburguesa 2 ($P = 0.239$), carne de hamburguesa 3 ($P = 0.992$) con un alfa de 0.05

Con respecto a el coeficiente de variación de la técnica tradicional, Petrifilm 3M™ y RIDA@COUNT su diferencia es pequeña en cada una de las muestras, lo que sugiere que las técnicas de recuento son reproducibles, confiables y precisas para el recuento de mesófilos. El coeficiente de variación (máximo 10%) muestra que hay un alto grado de concordancia entre los resultados obtenidos en las tres repeticiones realizadas a cada uno de los alimentos, ya que se presenta en un porcentaje inferior al 10%, demostrando así la varianza relativa presente entre las mediciones.

Los parámetros de correlación (r) para aerobios mesófilos obtenidos a partir de las Placas Petrifilm 3M™ mesófilos y el método tradicional usando el agar Plate Count

(Fig1). fue de 0.9665, mientras que el obtenido con RIDA@COUNT (Fig 2).es de 0.9619 lo cual indica que existe una alta correlación lineal directa entre ambas técnicas, existiendo una mejor correlación entre el método tradicional y Petrifilm 3MTM en comparación con el método tradicional y RIDA@COUNT. Estos resultado son bueno con respecto a otros estudios realizado para determinar mesofilos en leche pasteurizada donde el coeficiente de correlación esta en un rango de (0.78-0.98).(Beuchat et al., 1998; Blackburn et al., 1996; Curiale et al., 1990; Ginn et al., 1986; Jordano et al., 1995; Senyk et al., 1987). Con otro estudio realizado para la enumeración de mesofilos aerobios en leche pasteurizada en Brasil, pudieron concluir que el coeficiente de correlación de 0.88 con Petrifilm 3MTM AC esta entre el rango (0.80-0.89) siendo este bueno, mientras que con la otra técnica Simplate se logro un coeficiente de correlación de <0.50 (Tavolaro et al., 2005).

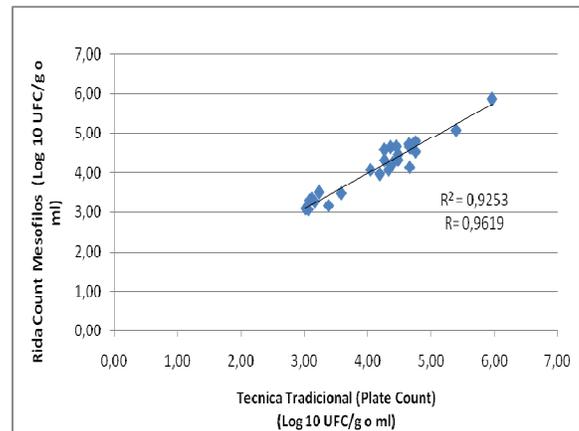
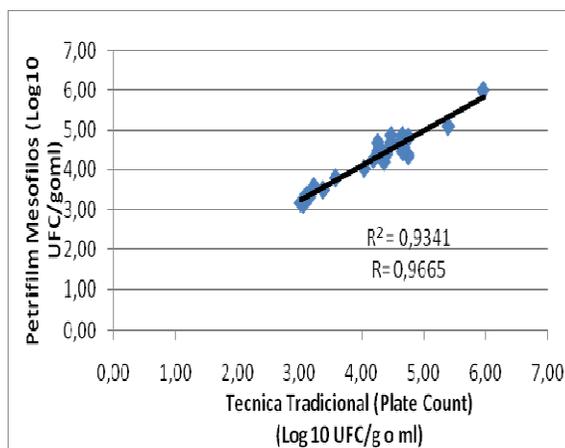


Fig 1 y Fig 2. Coeficientes de correlacion de los recuentos para la confirmacion de Mesofilos aerobios obtenidos en las Placas Petrifilm 3MTM y placas RIDA@COUNT apartir de los 9 grupos de alimentos.

Enterobacterias:

Con respecto al grado de concordancia entre los recuentos, que se determino con la desviación estándar y la media, los resultados obtenidos con las tres repeticiones para cada una de las tres técnicas de recuento, fueron en su mayoría menores del 10% CV, lo que muestra un alto grado de concordancia entre los datos. En las muestras donde el coeficiente de variación supero el 10% , se puede decir que fue resultado de errores en el montaje de la técnica; por ejemplo el volumen inadecuado de inculo, o una mala dispersión de las diluciones de las muestras.

Se puedo concluir que no hay diferencias estadísticamente significativas para las muestra: Leche pasteurizada (P= 0.475), queso campesino (P= 0.738), cuajada (P= 0.565), queso doble crema (P= 0.425), crema de leche 1(P= 0.371) ,Crema de leche 2 (P= 0.011), carne de hamburguesa 1(P= 0.025), carne de hamburguesa 2 (P= 0.713), carne de hamburguesa 3 (P= 0.421).

Los parámetros de correlación (r) para Enterobacterias obtenidos a partir de las Placas Petrifilm 3MTM y el método

tradicional usando el agar Mac Conkey (Fig 3). Fue de 0.9152, mientras que el obtenido con RIDA@COUNT (Fig 4). fue de 0.8875 lo cual indica que existe una alta correlación lineal directa entre ambas técnicas, existiendo una mejor correlación entre el método tradicional y Petrifilm 3MTM en comparación con el método tradicional y RIDA@COUNT.

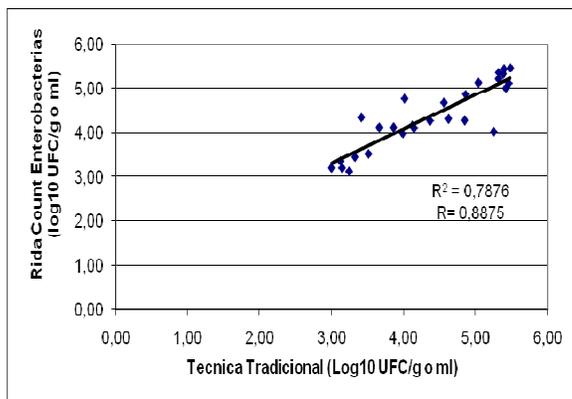
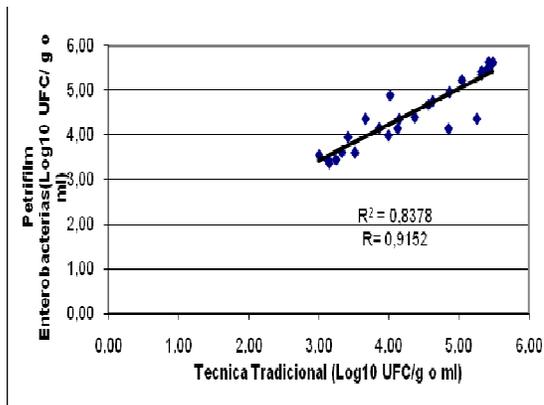


Fig 3 y Fig 4. Coeficientes de correlación de los recuentos para la confirmación de Enterobacterias obtenidos en las Placas Petrifilm 3MTM y placas RIDA@COUNT a partir de los 9 grupos de alimentos.

Coliformes:

Con respecto al coeficiente de variación de la técnica tradicional, Petrifilm 3MTM y RIDA@COUNT se puede decir que hay un alto grado de concordancia entre los

resultados para las 9 muestras de alimento. En las muestras donde el coeficiente de variación supero el 10% , se puede decir que fue resultado de errores en el montaje de la técnica; por ejemplo el volumen inadecuado de inculo, o una mala dispersión de las diluciones de las muestras.

Se determino que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas para cada muestra siendo el valor de P en la prueba de ANOVA > 0.05 ; teniendo como resultados para el queso campesino ($P = 0.682$) queso doble crema ($P = 0.195$), crema de leche 1 ($P = 0.537$), Crema de leche 2 ($P = 0.082$), carne de hamburguesa 1 ($P = 0.632$). Existe diferencias estadísticamente significativas entre las tres técnicas para las siguientes muestras: Leche pasteurizada ($P = 0.001$), cuajada ($P = 0.009$), carne de hamburguesa 2 ($P = 0.02$), carne de hamburguesa 3 ($P = 0.01$).

Los parámetros de correlación (r) para Coliformes obtenidos a partir de las Placas Petrifilm 3MTM Coliformes y el método tradicional usando el agar VRB (Fig 5). fue de 0.953, mientras que el obtenido con RIDA@COUNT (Fig 6).es de 0.941 lo cual indica que existe una alta correlación lineal directa entre ambas técnicas, existiendo una mejor correlación entre el método tradicional y Petrifilm 3MTM en comparación con el método tradicional y RIDA@COUNT. Con respecto a otros estudios realizados en la universidad de Córdoba, donde el objetivo era comparar las técnicas alternativas para el análisis microbiológico de los alimentos; El análisis estadístico de los resultados obtenidos en Petrifilm 3MTM serie 2000 y en VRBA, en los grupos de los seis lotes de alimentos mostró un coeficiente de correlación de (r) = 0.860 y se compararon las medias entre las dos técnicas donde se observo resultados muy cercanos. Concluyendo que Petrifilm 3MTM Series 2000 (recuento rápido de coliformes) puede considerarse una alternativa válida a la

Microbiología a tradicional.(Jordano et al., 1995).

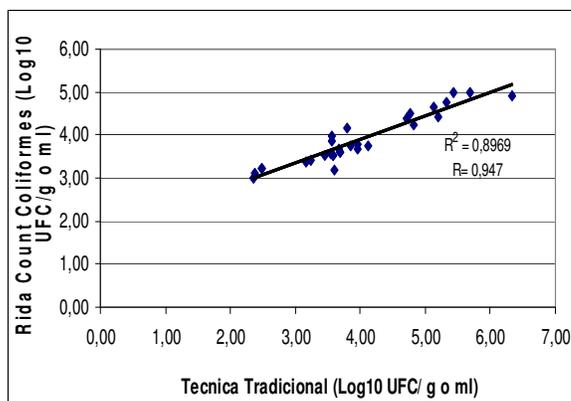
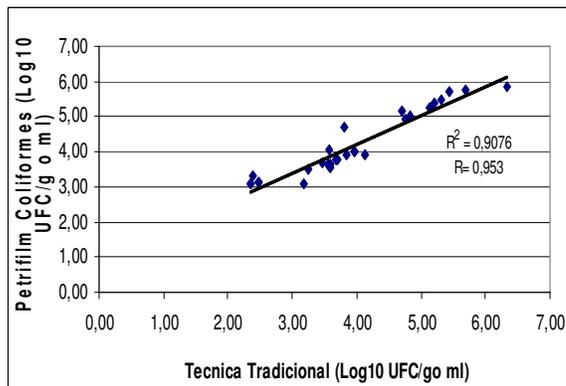


Fig 5 y Fig 6. Coeficientes de correlacion de los recuentos para la confirmacion de Coliformes totales obtenidos en las Placas Petrifilm 3MTM y placas RIDA@COUNT apartir de los 9 grupos de alimentos.

E. coli:

Con respecto al coeficiente de variación los resultados obtenidos con las tres repeticiones en cada una de las cuatro técnicas de recuento fueron en su mayoría menores del 10%, esto nos indica que hay alta concordancia entre los recuentos, sugiriendo que las Técnicas son reproducibles y confiables para el análisis microbiológico de alimentos. En las muestras donde el coeficiente de variación supero el 10% , se puede decir que fue resultado de errores en el montaje de la técnica; por ejemplo el volumen inadecuado de inoculo, o una mala dispersión de las

diluciones de las muestras, llegando a tener mayor recuperación de *E.coli* o recuentos de microorganismos contaminantes.

Se determino con los valores de P. que no hay diferencias estadísticamente significativas para las muestras: Leche pasteurizada (P= 0.09), queso campesino (P= 0.12), cuajada (P= 0.065), queso doble crema (P= 0.096), crema de leche 1(P=.986), Crema de leche 2 (P= 0.092), carne de hamburguesa 1(P= 0.661), carne de hamburguesa 2 (P= 0.204), carne de hamburguesa 3 (P= 0.775) con un alfa de 0.05.

Los parámetros de correlación (r) para *E.coli* obtenidos a partir de las Placas Petrifilm 3MTM *E.coli* y el método tradicional usando el agar Chromocult (Fig 7). fue de 0.969, mientras que el obtenido con RIDA@COUNT (Fig 8).es de 0.926 y para Coli ID (Fig 9) es de 0.882 de manera que si hay una correlación positiva entre el método tradicional y Petrifilm 3MTM , lo mismo ocurre con RIDA@COUNT y Coli ID, existiendo una mejor correlación entre el método tradicional y Petrifilm 3MTM en comparación con el método tradicional y RIDA@COUNT.

Estos resultados se pueden comparar con otros estudios los cuales comparan Placas Petrifilm 3MTM y el método tradicional para el recuento de Coliformes y *E.coli* en aguas, donde se obtuvo como resultado recuentos de coliformes fecales y *E. coli* en las 177 muestras analizadas de 102 y 103 UFC / ml . El promedio en log10 de los recuentos fue de 0.2, confirmando la presencia de coliformes fecales con las Placas Petrifilm 3MTM EC, siendo este resultado inferior que utilizando el método tradicional con el agar MFC. El coeficiente de correlación entre los dos métodos fue 0.949. Siendo este resultado mejor que los reportados en los estudios de comparación entre métodos de recuento en alimentos, los

cuales oscilan entre 0,85 a 0,93 (Blackburn et al., 1996).

Sin embargo, la prueba de t Student para datos apareados mostraron diferencias significativas entre los dos procedimientos con una significancia del $P \leq 0.001$. El promedio de los recuentos en log₁₀ se confirmo con las Placas Petrifilm 3M™ EC E. coli, mostraron recuentos más bajos (0,04 log₁₀) que utilizando el agar MFC. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa con la prueba "t" para datos apareados ($P = 0,126$).

El coeficiente de correlación entre estos dos tipos de medios fue 0.879. Concluyendo que las Placas Petrifilm 3M™ son más precisas y confiables para el recuento de E.coli en aguas.(Schraft*et al., 2005)

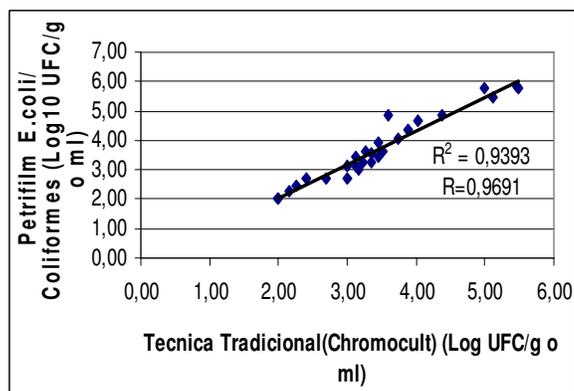
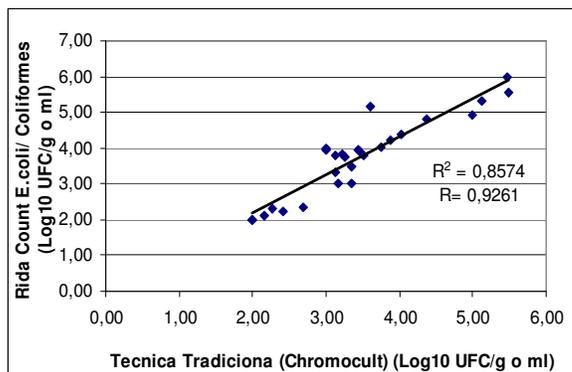
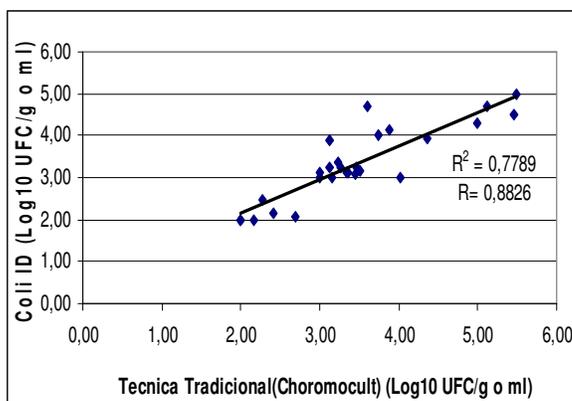


Fig 7, Fig 8.y Fig 9. Coeficientes de correlacion de los recuentos para la confirmacion de E.coli obtenidos en las Placas Petrifilm 3M™ , placas RIDA@COUNT y Coli ID apartir de los 9 grupos de alimentos.

S. aureus:

Con respecto al grado de concordancia entre los recuentos, que se determino con la desviación estándar y la media. Los resultados obtenidos con las tres repeticiones en cada una de las cuatro técnicas de recuento fueron menores del 10%, lo que muestra un alto grado de concordancia entre los datos. Encontrando que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas para las muestra: Leche pasteurizada ($P= 0.207$), queso campesino ($P= 0.076$), cuajada ($P= 0.123$), queso doble crema ($P= 0.196$), crema de leche 1($P= 0.143$), Crema de leche 2 ($P= 0.102$), carne de hamburguesa 1($P= 0.244$) carne de hamburguesa 2 ($P= 0.305$), carne de hamburguesa 3 ($P= 0.782$) con un nivel de significancia del 95%.

Los parámetros de correlación (r) para S.aureus obtenidos a partir de las Placas Petrifilm 3M™ para S.aureus y el método tradicional usando el agar Baird Parker (Fig 10). fue de 0.889, mientras que el obtenido con RIDA@COUNT (Fig 11).es de 0.9798 y el obtenido con Biomerieux (Fig 12) fue de 0.95 lo cual indica que existe una alta correlación lineal directa entre ambas técnicas, existiendo una mejor correlación

entre el método tradicional y RIDA@COUNT en comparación con el método tradicional y Petrifilm 3M™.

En el estudio que se realizó para evaluar Placas Petrifilm 3M™ Staph Express para el diagnóstico de mastitis causadas por *Staphylococcus aureus*, donde se utilizaron 4 muestras de leche. En uno de los experimentos se determinó la prevalencia y sensibilidad relativa en función de diferentes métodos microbiológicos como: centrifugación, incubación y Petrifilm 3M™, donde Petrifilm 3M™ obtuvo mayor sensibilidad con un nivel de significancia del 95% y se obtuvo una prevalencia de *staphylococcus aureus* del 86% en las 4 muestras de leche, en comparación con las muestras procesadas con el método estándar. (Silva et al., 2005)

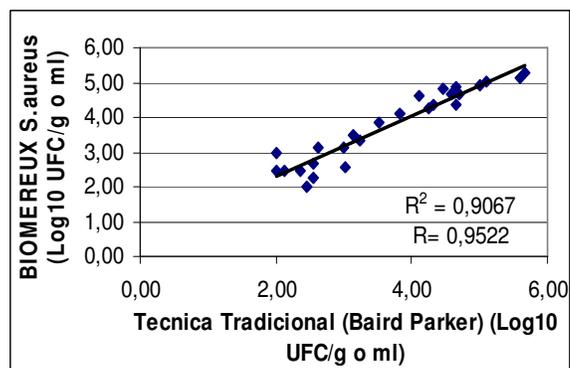
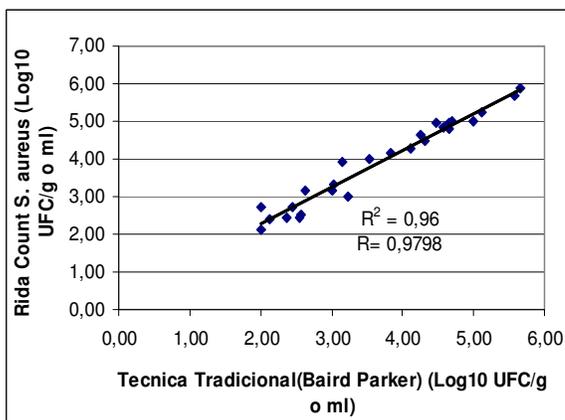
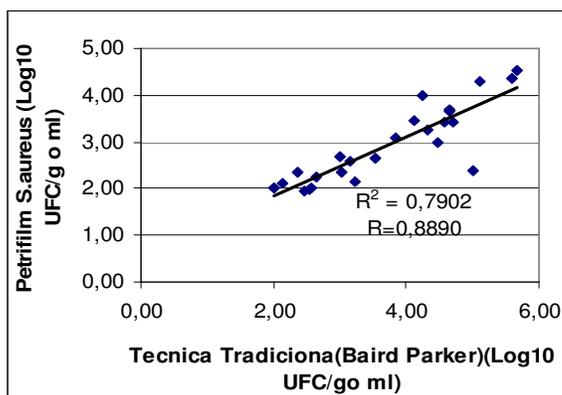


Fig 10, Fig 11.y Fig 12. Coeficientes de correlación de los recuentos para la confirmación de S.aureus obtenidos en las Placas Petrifilm 3M™, placas RIDA@COUNT y Biomerieux, a partir de los 9 grupos de alimentos.

Hongos y levaduras.

Con respecto al grado de concordancia entre los recuentos, que se determinó con la desviación estándar y la media, los resultados obtenidos con las tres repeticiones para cada una de las tres técnicas de recuento, fueron en su mayoría menores del 10% CV, lo que muestra un alto grado de concordancia entre los datos.; lo que sugiere que las técnicas de recuento son reproducibles, confiables y precisas para el recuento de hongos y levaduras. Encontrando que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas para cada muestra: Leche pasteurizada ($P = 0.161$), queso campesino ($P = 0.366$), cuajada ($P = 0.070$), queso doble crema ($P = 0.324$), crema de leche 1 ($P = 0.122$), Crema de leche 2 ($P = 0.277$), carne de hamburguesa 1 ($P = 0.794$), carne de hamburguesa 2 ($P = 0.591$), carne de hamburguesa 3 ($P = 0.562$) con un nivel de significancia de 95%.

Los parámetros de correlación (r) para Hongos y levaduras obtenidos a partir de las Placas Petrifilm 3M™ y el método tradicional usando el agar Sabureaud (Fig 13). fue de 0.969, mientras que el obtenido

con RIDA@COUNT (Fig 14), de manera que si hay una correlación positiva entre el método tradicional y Petrifilm 3M™, lo mismo ocurre con RIDA@COUNT, existiendo una mejor correlación entre el método tradicional y Petrifilm 3M™. En un estudio donde se compara Las Placas Petrifilm 3M™ con los métodos tradicionales (ACC, VRBA, Levine EMB y agar OGYE) para la enumeración de bacterias aerobias Mesófilas, Coliformes, *Escherichia coli*, levaduras y mohos en seis lotes homogéneos de distintos grupos de alimentos (leche pasteurizada, yogur helados, huevos, carne picada, fresas frescas y congeladas judías verdes). Para todos los criterios microbiológicos aplicables a excepción de las levaduras y mohos y bacterias aerobias Mesófilas en judías verdes congeladas, los valores medios obtenidos con Placas Petrifilm 3M™ fueron superiores a los obtenidos con los métodos tradicionales. El coeficiente de correlación de Petrifilm 3M™ para bacterias aeróbicas, coliformes, levaduras y mohos vs. Los medios de cultivo ACC, VRBA y OGYE para los seis grupos de alimentos fueron de 0,897, 0,861 y 0,981, respectivamente. Concluyendo que hay una correlación positiva entre las técnicas para el recuento de microorganismos en alimentos. (Jordano et al., 1995)

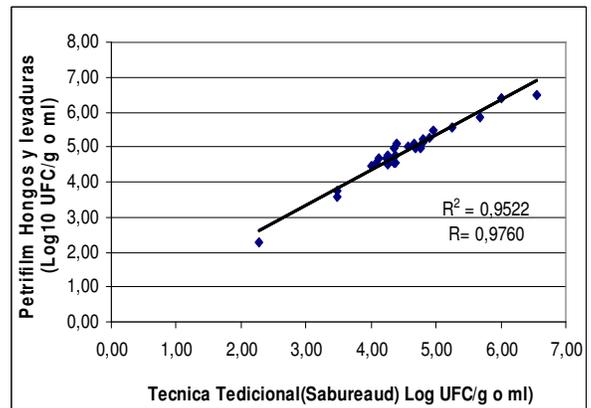


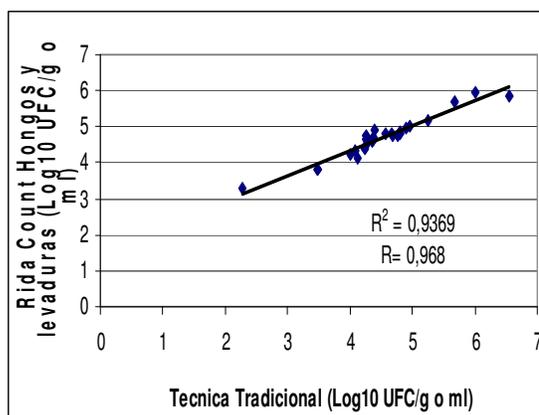
Fig 13, Fig 14. Coeficientes de correlación de los recuentos para la confirmación de Hongos y levaduras obtenidos en las Placas Petrifilm 3M™ y placas RIDA@COUNT a partir de los 9 grupos de alimentos.

Determinación de *Listeria* en superficies.

En la determinación de *Listeria* en superficies, se determinó que las placas Placas Petrifilm 3M™ para monitoreo de ambientes es selectiva, a pesar de que se utilizaron superficies contaminadas con *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas sp* y *E.coli* las placas demostraron el desarrollo de colonias que son pertenecientes a *Listeria*, concluyendo que los demás microorganismos no actuaron como interferentes.

CONCLUSIONES.

- Se determinó la eficiencia de las Placas Petrifilm 3M™, RIDA@COUNT, Coli ID, Baird Parker de Biomerieux con la técnica tradicional para la identificación de microorganismos indicadores en la industria de alimentos. Donde se logró evidenciar que estas técnicas son reproducibles, confiables y precisas para el recuento de Mesófilos, Enterobacterias, Coliformes totales, *E.coli*, *S.aureus* y Hongos y levaduras.
- El análisis estadístico para las nueve



(9) muestras de alimento, arrojó a partir del coeficiente de con el variación que existe un alto grado de concordancia para los diferentes ensayos realizados. En las muestras donde el coeficiente de variación supero el 10% , se puede decir que fue resultado de errores en el montaje de la técnica.

- Se determino que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas para cada muestra de alimento con un nivel de confianza del 95% con la prueba de ANOVA.
- Se realizo regresión lineal, que es una técnica estadística que nos ayudo conocer la relación o comportamiento existente entre la técnica tradicional vs Petrifilm 3M™ y la técnica tradicional vs RIDA@COUNT. Donde se evidencio por medio del coeficiente de corrección que existe un alto grado de correlación lineal directa entra la técnica tradicional y las técnicas rápidas de recuento para la mayoría de los microorganismos que fueron identificados. El coeficiente de correlación estuvo siempre en un rango de (0.78-0.98), siendo comparados con otros estudios realizados en las cuales utilizaron las mismas técnicas de recuento de microorganismos en alimentos.
- En la determinación de *Listeria* en superficies, se pruebo que las placas Placas Petrifilm 3M™ para monitoreo de ambientes es selectiva, a pesar de que se utilizaron superficies contaminadas con *Listeria*, *Pseudomonas* y *E.coli* las placas demostraron el desarrollo de colonias que son pertenecientes a *Listeria*, concluyendo que los demás microorganismos no actuaron como interferentes.

BIBLIOGRAFIA.

Baumgartner, A., Grand, M., Simmen, A., Halvax, M., 1993. Quantitative analysis of *E. coli* in water-comparison of ECDagar and Petrifilmk. Mitt. Geb. Lebensm.unters. Hyg. 84, 382– 387.

B. O. Silva, D. Z. Caraviello, A. C. Rodrigues, and P. L. Rugg . Evaluation of Petrifilm for the Isolation of *Staphylococcus aureus* from Milk Samples. Department of Dairy Science, University of Wisconsin, Journal of Dairy Science Vol. 88, No. 8, 2005.

Chisso Corp., Microbiology. 2008. [En línea].< <http://www.chisso.co/index.asp> > [Consulta:12 Septiembre 2008. Hora 3 p.m]

Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J., Williams, S. 2000. Bergeys Manual of Determinate Bacteriology. Philadelphia, USA. Lippincott Williams E. Wilkins. Pg 787.

H. Schraft*, L.A. Watterworth. Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water: comparison of 3Mk Petrifilmk plates with Standard plating procedures. Department of Biology, Lakehead University, Thunder Bay, ON, Canada P7B 5E1. Journal of Microbiological Methods 60 (2005) 335– 342.

Jordano R., López pez M.C., Rodríguez M.V., Córdoba M.G., Medina L.M., M.J. Córdoba Barrios. 1995. 1995.- Comparison of Petrifilm method to conventional methods for enumerating aerobic bacteria, coliforms, *Escherichia coli* and yeasts and molds in foods. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica Hungarica, 42(3): 255 , 255-259.

Micronoticias. 3M Microbiología. 2006. Placas Petrifilm para el Recuento de Aerobio. [En línea].< <ftp://ftp.mmm.com/pub/MX/MicronoticiasJulio>

[2006.pdf](#)> [Consulta: 13 de junio 2008 Hora: 6:28 p.m]

Paula Tavoraro; Analí Ramazotti Ferrati; Maria Teresa Destro; Mariza Landgraf; Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco. Performance of two ready-to-use systems for enumeration of aerobic mesophilic microorganisms in frozen goat milk. Departamento de Alimentos e Nutrição

Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. Brazilian Journal of Microbiology (2005) 36:295-300.

Perdomo, H. Casanova O.N. Ciganda V.S. 2001. Contaminación de agua subterránea con nitrato y coliformes en el litoral sudeste de Uruguay. Agrociencia. Vol 5. N°1. Pg:10-22.