

**Implementación y validación de métodos microbiológicos para el análisis de alimentos y bebidas en la empresa Laboratorio de Análisis Ambiental del Caribe S.A.S ubicado en la ciudad de Santa Marta-Magdalena, Colombia**

Katherine Rocio del Carmen Obeid Manjarres

Universidad Nacional Abierta y a Distancia  
Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería  
Maestría en Biotecnología Alimentaria

2022

**Implementación y validación de métodos microbiológicos para el análisis de alimentos y bebidas en la empresa Laboratorio de Análisis Ambiental del Caribe S.A.S ubicado en la ciudad de Santa Marta-Magdalena, Colombia**

Katherine Rocio del Carmen Obeid Manjarres

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:  
Magister en Biotecnología Alimentaria

Modalidad  
Proyecto Aplicado

Director (a):  
PhD. Carolina María Bedoya Serna

Universidad Nacional Abierta y a Distancia  
Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería  
Maestría en Biotecnología Alimentaria

2022

### **Declaración de Derechos de Propiedad Intelectual**

Los autores de la presente propuesta manifestamos que conocemos el contenido del Acuerdo 06 de 2008, Estatuto de Propiedad Intelectual de la UNAD, Artículo 39 referente a la cesión voluntaria y libre de los derechos de propiedad intelectual de los productos generados a partir de la presente propuesta. Asimismo, conocemos el contenido del Artículo 40 del mismo Acuerdo, relacionado con la autorización de uso del trabajo para fines de consulta y mención en los catálogos bibliográficos de la UNAD.

### **Agradecimientos**

Le agradezco a Dios por ser el forjador de mi camino, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias que han moldeado mi vida.

A mis padres Rocio Manjarres, Juan Carlos Obeid y Antonio García por su apoyo incondicional, por los valores que me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de recibir la mejor educación que se le puede brindar a un ser humano, sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A la empresa Laboratorio de Análisis Ambiental del Caribe S.A.S y su increíble grupo de trabajo, especialmente a Yolanda Duran, Yahir Mendoza y Félix Jaramillo, gracias a ellos este proyecto fue posible, su confianza en mí ha sido invaluable y su apoyo ha sido absolutamente incondicional. Gracias por haberme brindado la oportunidad de desarrollar este proyecto aplicado, por compartir sus conocimientos y por su amistad.

Gracias a los profesores y a la UNAD por ser parte de mi camino profesional, y especialmente a la docente Carolina Bedoya por su dedicación, apoyo y por aceptar hacer parte de este proyecto.

Por último, un agradecimiento especial a mi grupo de “compañeritos” que hicieron que esta etapa profesional fuera un trayecto de alegría, aprendizaje y de mucha solidaridad, realmente fue gratificante haberlos conocido.

*“Escucha lo que te mando: Esfuérzate y sé valiente. No temas ni desmayes, que yo soy el Señor tu Dios, y estaré contigo por dondequiera que vayas.”. Josue 1:9*

## Resumen

El objetivo de este proyecto fue establecer métodos microbiológicos convencionales validados para la detección de agentes patógenos en alimentos y bebidas en la empresa Laboratorio de Análisis Ambiental del Caribe S.A.S. Para ello, se determinaron los microorganismos considerados indicadores de contaminación como lo son mesófilos aerobios y los patógenos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Las matrices alimenticias se seleccionaron teniendo en cuenta los productos con mayor demanda comercial, se destacan, productos cárnicos, avícolas, pesca y bebidas. Posteriormente, se implementaron los métodos analíticos, los cuales fueron adaptados teniendo en cuenta algunas condiciones de la empresa. Por último, se procedió a establecer un protocolo de validación para la detección de dichos agentes patógenos en alimentos y bebidas y, mediante análisis estadístico, se determinó la precisión, veracidad y exactitud de cada uno de los métodos. Según el análisis estadístico, no se evidenció diferencia significativa de las mediciones entre los analistas para repetibilidad, reproducibilidad, porcentaje de recuperación, sensibilidad, especificidad y eficiencia de los métodos evaluados, encontrándose valores dentro de los límites establecidos por los métodos. Adicionalmente, se identificaron los índices máximos permisibles para determinar el nivel de buena y aceptable calidad de las muestras de acuerdo con los requerimientos microbiológicos estipulados por las normas regulatorias nacionales. Se concluye que fue posible establecer y validar los métodos microbiológicos convencionales para la detección de agentes patógenos en alimentos.

**Palabras claves:** enfermedades de transmisión alimentaria; mesófilos aerobios; *Staphylococcus aureus*; *Salmonella* spp; *Escherichia coli*.

### **Abstract**

The aim of this project was to establish validated conventional microbiological methods for the detection of pathogens in food and beverages at the company Laboratorio de Analisis Ambiental del Caribe S.A.S. For this, the microorganisms considered indicators of contamination were determined, such as aerobic mesophiles and pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. The food matrices were selected considering the products with the highest commercial demand, highlighting meat, poultry, fish, and beverage products. Subsequently, the analytical methods were implemented, which were adapted considering some conditions of the company. Finally, a validation protocol was established for the detection of these pathogens in food and beverages and, through statistical analysis, the precision, veracity, and accuracy of each of the methods was determined. According to the statistical analysis, there was no significant difference in the measurements between the analysts for repeatability, reproducibility, recovery percentage, sensitivity, specificity, and efficiency of the methods evaluated, finding values within the limits established by the methods. Additionally, the maximum permissible indices were identified to determine the level of good and acceptable quality of the samples in accordance with the microbiological requirements stipulated by the national regulatory standards. It is concluded that it was possible to establish and validate conventional microbiological methods for the detection of pathogens in food.

**Keywords:** foodborne illnesses; aerobic mesophiles; *Staphylococcus aureus*; *Salmonella* spp; *Escherichia coli*.

## Tabla de Contenido

<b>Introducción .....</b>	<b>16</b>
<b>Planteamiento del Problema .....</b>	<b>18</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>21</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>23</b>
<b>Objetivo General .....</b>	<b>23</b>
<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>23</b>
<b>Marco Conceptual y Teórico.....</b>	<b>24</b>
<b>Metodología .....</b>	<b>30</b>
<b>Fase 1: Determinación de los agentes microbianos y tipos de alimentos y bebidas de análisis en el laboratorio.....</b>	<b>30</b>
<b>Fase 2: Implementación de métodos microbiológicos. ....</b>	<b>31</b>
<b>Fase 3: Protocolo de validación de métodos .....</b>	<b>38</b>
<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>41</b>
<b>Fase 1: Determinación de los agentes microbianos que se detectaron y el tipo de alimento y bebidas que se analizaron en el laboratorio .....</b>	<b>41</b>
<b>Fase 2: Implementación de métodos microbiológicos.....</b>	<b>49</b>
<b>Fase 3: Protocolo de validación de métodos .....</b>	<b>53</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Verificación de validación del método para la determinación de microorganismos Mesófilos aerobios .....</i></li> </ul>	<b>56</b>

• <i>Verificación de validación del método para la determinación de Staphylococcus aureus coagulasa positiva</i> .....	63
• <i>Verificación de validación del método para la enumeración de Escherichia coli</i>	73
• <i>Verificación de validación del método horizontal para la detección de Salmonella spp</i> .....	82
<b>Conclusiones</b> .....	93
<b>Recomendaciones</b> .....	95

## Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama de flujo para la determinación de mesófilos aerobios. Fuente: NTC 4519:2009 .....	32
Figura 2. Diagrama de flujo para la determinación de <i>Salmonella</i> . Fuente: NTC 4574:2007.....	34
Figura 3. Diagrama de flujo para la determinación de <i>E. Coli</i> . Fuente: BAM capítulo 4 .....	36
Figura 4. Diagrama de flujo para la determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva. Fuente: NTC 4779:2007 .....	38
Figura 5. Resultados prueba productividad de <i>E. Coli</i> en medio Agar Plate Count.....	58
Figura 6. Resultados del recuento del proceso de verificación de validación del método horizontal para microorganismos aerobios en muestras de alimentos y bebidas. ....	62
Figura 7. Resultados prueba productividad y selectividad de <i>Staphylococcus aureus</i> en medio Agar Baird Parker .....	66
Figura 8. Resultados del recuento del proceso de verificación de validación del método horizontal para <i>Staphylococcus aureus</i> en muestras de alimentos y bebidas. ....	71
Figura 9. Resultados prueba de coagulasa para la confirmación de la presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en muestras de alimentos y bebidas. ....	72
Figura 10. Resultados prueba productividad y selectividad de <i>Escherichia coli</i> en medio L-EMB .....	76
Figura 11. Resultados del recuento del proceso de verificación de validación para la enumeración de <i>Escherichia coli</i> en muestras de alimentos y bebidas. ....	80
Figura 12. Resultados prueba confirmatoria de la presencia de <i>Escherichia coli</i> en muestras de alimentos y bebidas.....	81
Figura 13. Resultados prueba productividad y selectividad de <i>Salmonella</i> en los medios Agar XLD y Bismuto Sulfito .....	86

Figura 14. Resultados del proceso de verificación de validación del método horizontal para la detección de <i>Salmonella</i> spp en muestras de alimentos y bebidas. ....	90
Figura 15. Resultados prueba confirmatoria de la presencia de <i>Salmonella</i> en muestras de alimentos y bebidas.....	91

### Lista de Tablas

Tabla 1. Requisitos microbiológicos para productos cárnicos procesados cocidos.....	42
Tabla 2. Requisitos microbiológicos para productos cárnicos procesados crudos frescos congelados o no.....	42
Tabla 3. Requisitos microbiológicos para productos cárnicos procesados crudos madurados o fermentados o acidificados o los dos o los tres.....	42
Tabla 4. Requisitos microbiológicos del pollo beneficiado, pollo en canal .....	43
Tabla 5. Requisitos microbiológicos para la comercialización de aves benéficas enteras, despresadas y/o deshuesadas que se someten a marinado .....	44
Tabla 6. Características microbiológicas de los jugos y pulpas de frutas congeladas .....	44
Tabla 7. Características microbiológicas de los jugos y pulpas de frutas pasteurizados .....	44
Tabla 8. Características microbiológicas de los refrescos de frutas higienizadas con duración máxima de 30 días .....	45
Tabla 9. Características microbiológicas de los refrescos de frutas higienizadas con duración mayor de 30 días .....	45
Tabla 10. Requisitos microbiológicos para productos de la pesca .....	46
Tabla 11. Productos alimenticios y microorganismos escogidos para la validación .....	47
Tabla 12. Métodos para implementar para la detección de microorganismo .....	49
Tabla 13. Recursos necesarios para la implementación y validación de los métodos.....	51
Tabla 14. Consideraciones para determinar el nivel de productividad y selectividad de los medios de cultivo.....	54
Tabla 15. Tabla de contingencia para la expresión de resultados cualitativos .....	55

Tabla 16. Resultados prueba Ecometría del medio de cultivo Agar Plate Count para el del Método Horizontal para el Recuento de Microorganismos.....	57
Tabla 17. Resultados verificación de validación del Método Horizontal para el Recuento de Microorganismos: Técnica de recuento de colonias a 30 °C en muestras de alimentos y bebidas .....	61
Tabla 18. Resultados prueba Ecometría del medio de cultivo Agar Baird Parker para el del Método Horizontal para el Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva.....	65
Tabla 19. Resultados verificación de validación del Método Horizontal para el Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva en muestras de alimentos y bebidas .....	70
Tabla 20. Resultados prueba ecometría del medio de cultivo Agar L-EMB para el método de Número Más Probable (NPM) para la enumeración de <i>E. Coli</i> .....	75
Tabla 21. Resultados verificación de validación para la enumeración de <i>Escherichia coli</i> , método de tubos de fermentación (NPM) en muestras de alimentos y bebidas .....	79
Tabla 22. Resultados prueba ecometría del medio de cultivo Agar XLD para el del método horizontal para la detección de <i>Salmonella</i> spp .....	84
Tabla 23. Resultados prueba ecometría del medio de cultivo Agar Bismuto Sulfito para el del método horizontal para la detección de <i>Salmonella</i> spp .....	85
Tabla 24. Resultados verificación de validación del método horizontal para la detección de <i>Salmonella</i> spp en muestras de alimentos y bebidas .....	89

**Lista de ecuaciones**

Ecuación 1. Recuento de colonias mesófilas UFC/g o mL.....	58
Ecuación 2. número de $\alpha$ de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva para caja seleccionada.	66
Ecuación 3. número de $N$ de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva presente en la porción de muestra.....	67
Ecuación 4. número de $N$ de <i>Escherichia coli</i> presente en la porción de muestra.....	77
Ecuación 5. Porcentaje de sensibilidad.....	87
Ecuación 6. Porcentaje de especificidad.....	87
Ecuación 7. Porcentaje de eficiencia.....	87

### Lista de Abreviaturas

AOAC: Asociación de Colaboración Analítica Oficial

ATCC: American Type Culture Collection

BAM: Manual Bacteriológico de Alimentos

BHI: Caldo infusión cerebro-corazón

BPA: Buenas Prácticas Agrícolas

BPL: Buenas Prácticas de Laboratorio

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura

CONPES: Consejo Nacional de Política Económica y Social

EC: Caldo diferencial para *Escherichia coli*

ETA: Enfermedades de transmisión alimentaria

FAO: Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

g: Gramos, unidad de medida de masa

GTC: Guía Técnica Colombiana

ICA: Instituto Colombiano Agropecuario

ICONTEC: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación

IEC: Comisión Electrónica Internacional

INS: Instituto Nacional de Salud

INVIMA: Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

ISO: Organismo Internacional para la Estandarización

L-EMB: Levine eosina azul de metileno

mL: Mililitro, unidad de medida de volumen

NPM: Número Más Probable

NTC: Norma Técnica Colombiana

OCDE: Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico

OEC: Organismos de Evaluación de la Conformidad

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONAC: Organismo Nacional de Acreditación en Colombia

PCA: Agar Plate Count

RSD: Desviación estándar relativa

RVS: Medio Rappaport Vassiliadis

SIC: Superintendencia de Industria y Comercio

SNACK: Sistema Nacional de Normalización, Certificación y Metrología

Spp: Especie, en las que se incluye varias especies de un microorganismo

TSI: Agar Triple-Azúcar-Hierro

UFC: Unidades formadoras de colonias

UIQPA: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

XLD: Agar Xilosa Lisina Desoxicolato

## **Introducción**

La presencia de microorganismos en los alimentos no son sinónimo de algún tipo de riesgo al momento de su consumo o de mala calidad de un producto. Algunos alimentos están compuestos por microorganismos, que inclusive, pueden brindar beneficios para la salud.

Gran parte de los alimentos se convierten en potencialmente peligrosos cuando se han violado los principios de higiene e inocuidad. Por esta razón, el aseguramiento de la calidad en la industria agroalimentaria se ha convertido en el cimiento fundamental a la hora de fabricar, producir, procesar y comercializar productos alimentarios, con el fin de que se puedan considerar seguros para el consumidor.

Por otro lado, los laboratorios de ensayo dedicados al diagnóstico microbiológico y fisicoquímico de los alimentos y bebidas, permite a la industria de alimentos acceder a la experiencia, recursos humanos, medios y métodos técnicamente competentes y confiables.

Para garantizar la confiabilidad de sus ensayos, los laboratorios destinados al análisis de alimentos y bebidas, por medio de procesos de acreditación de sus técnicas, deben cumplir con ciertos criterios ante un agente regulador. En Colombia, la institución reguladora es el Organismo Nacional de Acreditación en Colombia – ONAC.

Dentro del cumplimiento de los estándares de calidad, en la norma ISO 17025:2017, se menciona la necesidad de llevar a cabo procesos de validación de cada uno de los métodos de ensayo implementados en el laboratorio, con el fin de evidenciar un alto grado de confianza en la emisión de resultados (Carrillo y Lozano, 2008).

A su vez, los procesos de validación deben ser respaldados por medio de análisis estadísticos, que permitan establecer las condiciones de recolección, manejo, descripción y análisis de la información, que conlleven a obtener juicios adecuados y apoyen una correcta

evaluación para la toma de decisiones (Julio, 2013), los cuales se obtienen a partir de la evaluación de parámetros como la precisión, exactitud, especificidad, selectividad, eficiencia, entre otros específicos de acuerdo con el método.

Particularmente, en la ciudad de Santa Marta, Magdalena, no se cuenta con laboratorios acreditados que realicen análisis de alimentos y bebidas, por lo que muchas empresas del sector se ven obligadas a realizar estudios fuera de la ciudad. Esta situación, además de resultar costosa, se ha convertido en una excusa para omitir este tipo de análisis, dejando en entredicho la calidad e inocuidad de los alimentos comercializados.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, resulta importante que en la ciudad existan entidades, de carácter público o privado, que sean un apoyo en la cadena productiva de este sector alimentario.

Por tal motivo, el objetivo del presente proyecto fue establecer métodos microbiológicos convencionales validados para el análisis de alimentos y bebidas en la empresa Laboratorio de Análisis Ambiental del Caribe S.A.S. Se determinaron las condiciones de trabajo, para cada uno de los métodos normalizados, bajo los estándares establecidos por la NTC-ISO/IEC 17025:2017. Esto con el fin de brindar resultados confiables y seguros, en pro de alcanzar la acreditación de la entidad y ser el primer laboratorio de carácter privado en brindar este tipo de servicios de apoyo al diagnóstico en la ciudad de Santa Marta.

## **Planteamiento del Problema**

Actualmente, las exigencias de los consumidores son cada vez mayores respecto a la calidad de los productos, su precio y disponibilidad. Las empresas modernas comprenden que para permanecer en el mercado y garantizar una buena participación es fundamental la satisfacción de los clientes, los cuales demandan por alimentos que cumplan con sus expectativas.

La implementación de un Sistema de Gestión de la Calidad es indispensable para la industria de alimentos, ya que les permite ser competitivas, eficaces y eficientes en el mercado. Aplicar un trabajo mancomunado permite a la industria cumplir los objetivos planteados para garantizar esa calidad deseada (Caliba, 2014).

Bajo la necesidad de garantizar alimentos inocuos y de calidad, nacen los laboratorios de ensayo y de apoyo al diagnóstico. Estas empresas se permiten contar con la experiencia, los recursos humanos, los medios y los métodos técnicamente competentes para garantizar confianza en sus resultados. De esta manera, dichas entidades se convierten en un eslabón de la cadena productiva, brindando confiabilidad a los productos y servicios disponibles en el mercado.

Para el logro de sus objetivos, los laboratorios deben asegurar que los factores técnicos y humanos estén controlados para reducir, eliminar y prevenir fallas o errores. Para ello, la Norma ISO 17025:2017 establece los “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración”. Al seguir los lineamientos de esta Norma y, acreditar los métodos de ensayo utilizados, los laboratorios adoptan una estructura operativa de trabajo. Donde, la información se documenta en procedimientos técnicos y administrativos efectivos para guiar las acciones coordinadas de las personas y equipos y de manera, asegurar la calidad de los datos generados. La acreditación otorga al laboratorio un reconocimiento formal y aval de su

competencia técnica para llevar a cabo ensayos y calibraciones y emitir resultados fiables (Caliba, 2014).

En Colombia, la Superintendencia de Industria y Comercio – SIC inició en 1994 la actividad de acreditación. Entre 1994 y 2009, la SIC acreditó 357 Organismos de Evaluación de la Conformidad – OEC.

En 2006, se produjo el documento CONPES 3446 del Consejo Nacional de Política Económica y Social. En él, se establecen los lineamientos para el desarrollo de una política nacional: i) Reorganizar el marco institucional del Sistema Nacional de Normalización, Certificación y Metrología (SNACK); ii) Fortalecer las actividades de expedición de reglamentos técnicos, normalización, acreditación, designación, evaluación de la conformidad y metrología; iii) Obtener el reconocimiento internacional del Subsistema Nacional de la Calidad (Organismo Nacional de Acreditación de Colombia, 2021).

En Colombia, la entidad que acredita la competencia técnica de los Organismos de Evaluación de la Conformidad es el Organismo Nacional de Acreditación de Colombia – ONAC. Este Organismo, ejerce como autoridad de monitoreo en buenas prácticas de laboratorio de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) y desempeña las funciones de Organismo Nacional de Acreditación de Colombia. Esto conforme con la designación contenida en el capítulo 26 del Decreto 1074 de 2015 y las demás normas que los modifiquen, sustituyan o complementen (Organismo Nacional de Acreditación de Colombia, 2021).

Por su parte, los laboratorios antes de someterse a un proceso de acreditación deben tener en cuenta los requisitos exigidos por la NTC- ISO/IEC 17025: 2017. En esta se definen los requisitos que los laboratorios de ensayo y calibración deben cumplir para demostrar su

competencia y capacidad de generar resultados técnicamente válidos. Esta norma comprende en una primera parte lo referente a la gestión documental, en una segunda parte, hace referencia al componente técnico que el laboratorio debe implantar en la validación de sus métodos de ensayo. En los procesos de validación es necesario el uso de la estadística para dar cumplimiento a los criterios de calidad, previamente especificados para cada método y, así confirmar que estos son aptos para el fin previsto (NTC-ISO 17025, 2017). Este es el paso fundamental para la obtención de la acreditación, lo que conlleva a una confiabilidad y finalmente reconocimiento de la competencia de la entidad.

Por otro lado, la ciudad de Santa Marta no cuenta con un laboratorio acreditado y/o autorizado por entidades regulatorias como la ONAC, INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos), ICA (Instituto Colombiano Agropecuario), entre otras, que realice análisis de calidad de alimentos y bebidas.

Se ha identificado que la ciudad más cercana que brinda este tipo de servicios es Barranquilla, por tal motivo, muchas de las empresas dedicadas a la fabricación, producción, procesamiento y comercialización de productos alimenticios optan por realizar estudios fuera de la ciudad. Esta situación aumenta los costos, por lo que algunas empresas omiten este tipo de análisis dejando entre dicho la calidad e inocuidad de sus productos. Por lo tanto, es de suma importancia que la ciudad cuente con este tipo de entidades, ya sea de carácter público o privado, que apoyen la cadena del sector alimentario.

Con base en lo expuesto anteriormente, se plantea la siguiente pregunta de investigación:  
¿Los resultados estadísticos de las validaciones de los métodos para el análisis de alimentos y bebidas, permitirán al Laboratorio de Análisis Ambiental del Caribe S.A.S. determinar la aceptabilidad y confiabilidad de los métodos utilizados?

## Justificación

El no cumplimiento de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), en los diferentes eslabones de la cadena agroalimentaria, pueden ocasionar en la población Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) (Consejo Nacional de Política Económica Social, 2008).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades diarreicas representan el 95% de las ETAs en América. Cada año, aproximadamente 77 millones de personas sufren este tipo de enfermedad, siendo el 40% menores de 5 años. Más de 9.000 personas mueren a causa de estas enfermedades, de los cuales 2000 son niños menores de 5 años. Los agentes etiológicos más comunes de ETAs son: *Norovirus*, *E. coli*, *Campylobacter* y *Salmonella* (OMS, 2015).

En la actualidad, la ciudad de Santa Marta no cuenta con un laboratorio que realice análisis microbiológicos y fisicoquímicos para alimentos y bebidas, obligando a las industrias de la región a solicitar este tipo de servicios fuera de la ciudad, elevando así, los costos de producción y comercialización de sus productos. En otros casos, esta condición desencadena en la omisión del control de calidad de alimentos, poniendo en riesgo la salud del consumidor.

Dicho lo anterior, el Laboratorio de Análisis Ambiental del Caribe S.A.S, una empresa que actualmente está enfocada en el sector ambiental, tiene dentro de su visión ser uno de los primeros laboratorios de la ciudad en realizar análisis microbiológicos en alimentos y bebidas; enfocados en garantizar la calidad de sus resultados a través de la implementación de métodos analíticos confiables, precisos y adecuados de acuerdo con los requisitos exigidos por legislación nacional. Su interés es cumplir con los más altos estándares de calidad exigidos por la norma ISO 17025:2017 y sobre todo, autorizados por los entes reguladores como el Instituto Nacional

de Salud (INS), Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), entre otros.

Finalmente, esto permitirá al Laboratorio de Análisis Ambiental del Caribe ser la primera entidad de carácter privado en brindar este tipo de servicios de apoyo al diagnóstico en la ciudad, permitiendo a las empresas dedicadas al sector agroalimentario realizar este tipo de análisis en la ciudad para cumplir con lo establecido por la normatividad nacional.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Establecer métodos microbiológicos convencionales validados para el análisis de alimentos y bebidas en la empresa Laboratorio de Análisis Ambiental del Caribe S.A.S.

### **Objetivos Específicos**

Identificar los microorganismos y las muestras de alimentos y bebidas de objeto de estudio de acuerdo con los requerimientos comerciales.

Implementar métodos analíticos microbiológicos para alimentos y bebidas que sean posible adaptar y/o adoptar teniendo en cuenta los recursos y las posibilidades de la empresa.

Establecer un protocolo de validación métodos microbiológicos convencionales para la detección de agentes patógenos en alimentos y bebidas.

## **Marco Conceptual y Teórico**

La calidad en la industria agroalimentaria se ha convertido en uno de los pilares fundamentales para las empresas o establecimientos dedicados a la fabricación, producción, procesamiento y comercialización de productos alimenticios para brindar productos seguros para el consumo y la salud humana. Es por ello, que existen diversos entes a nivel nacional e internacional que ayudan en el proceso de diagnóstico para el aseguramiento de la calidad y seguridad de dichos artículos. Para el caso de los laboratorios, se pretende una mejora continua del sistema de calidad, tanto en la gestión como en los protocolos de procesamiento de análisis, donde es primordial la validación de ensayos, es por ello, que varias organizaciones como la Organización Internacional para la Estandarización (ISO), Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (UIQPA) y el Organismo Nacional de Acreditación de Colombia (ONAC), brindan guías, normas y protocolos para ser adaptados o adoptados con el fin de garantizar resultados confiables (Comisión del Codex Alimentarius, 2002).

Por medio de la Organización Internacional de Estandarización (ISO) y la Comisión Electrónica Internacional (IEC), se plantea la norma ISO/IEC 17025, donde se estipula que, los organismos de acreditación que reconocen la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración deben basarse en esta norma para otorgar dicho reconocimiento. Dichas validaciones estipuladas como requisito son de gran importancia para los laboratorios dado que determina la capacidad de satisfacción de los requisitos para la aplicación deseada y estimaciones de características, como el rendimiento analítico y diagnóstico de una prueba, permitiendo, además, mayor confiabilidad en la emisión de resultados (NTC-ISO/IEC 17025, 2017).

Validar es evidenciar con un alto grado de confianza, a través de información documentada, un proceso determinado que, producirá de forma consistente, productos que

reúnen las características de calidad predefinidas. Los resultados de la validación de métodos pueden utilizarse para juzgar la calidad, la fiabilidad y la constancia de los resultados analíticos, se trata de una parte integrante de cualquier buena práctica analítica (Carrillo y Lozano, 2008).

El proceso de validación inicia con las actividades de pre-validación, las cuales consisten en la recopilación de la información relacionada con el proceso; en la revisión de las evaluaciones de riesgos; la calificación técnica a las instalaciones locativas y a los equipos; existencia de procedimientos para las tareas u operaciones y el entrenamiento a los trabajadores (Carrillo y Lozano, 2008).

Posteriormente se elaboran los protocolos, en donde se definen los objetivos específicos de las evaluaciones a ejecutar; las responsabilidades de cada una de las áreas involucradas en la validación; se establecen las variables de interés que se desean evaluar y el plan de monitoreo respectivo. Además, se incluyen los criterios de aceptación que no son otra cosa que la comparación de los resultados con los niveles permisibles o los resultados esperados (Carrillo y Lozano, 2008).

La validación de los ensayos que se desean aplicar debe incluir los siguientes aspectos: la validación de parámetros de calidad del método y proceso y la adecuación de estos mismos a los requerimientos analíticos precisos determinados con anticipación. Además, se debe establecer el tipo de validación, ya que éste puede ser normalizado o no normalizado. En ese sentido, el método normalizado aquel que se basa en las normas emitidas por entidades regionales, nacionales e internacionales y no normalizado donde se trata de un método propio o del laboratorio (Camaro et al., 2015).

Existen dos tipos de modalidad de validación, en las que se encuentran la validación primaria y la secundaria o también llamada verificación. La validación primaria se basa en

procesos exploratorios, cuyo fin es establecer los límites operacionales y las características del desempeño de un nuevo método modificado, debe dar origen a especificaciones numéricas y descriptivas del objeto de interés. La validación secundaria, ocurre cuando el laboratorio quiere implementar un método desarrollado en otro lugar, se basa en la reunión de evidencias en donde se conste que el laboratorio está en capacidad para cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria (Camaro et al., 2015).

La validación secundaria es la demostración, mediante experimentos, que un método establecido funciona de acuerdo con sus especificaciones, cuando es empleado por un usuario. El propósito de la validación secundaria es establecer si el nuevo método satisface realmente las necesidades del laboratorio, esta fase es controlada y organizada por un laboratorio experto, pero se desarrolla en otros laboratorios colaboradores y tiene como objetivo principal observar el comportamiento del método utilizando muestras comunes, así como situaciones que pueden ocurrir cuando el uso del método sea extendido a la práctica (Meylin et al., 2010).

Para el caso de validaciones de métodos cualitativos y cuantitativos se evalúan parámetros como la sensibilidad, especificidad, eficiencia, exactitud, límite de detección, precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y exactitud. Normalmente, se utilizan mediciones estadísticas que ayudan a establecer si el método se encuentra dentro de un parámetro aceptable o no. Dentro de las mediciones estadísticas se encuentra la media, la desviación estándar, coeficiente de variación, y varianza (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010).

La sensibilidad en un método cualitativo expone la capacidad del método de detectar un analito/parámetro al analizar una muestra determinada, respondiendo de forma positiva, es decir, es la fracción total del número de resultados positivos obtenidos en el método (INS, 2015). La especificidad hace referencia a su capacidad para detectar una gama de microorganismos que

pueden estar presentes en la muestra y se pueden determinar a través del desarrollo del crecimiento en los medios de cultivo, es decir, es la fracción total del número de resultados negativos obtenidos en el método (Camaro et al., 2015).

El límite de detección se describe como el número más bajo del microorganismo en estudio que en una muestra puede detectarse, pero que no necesariamente se puede cuantificar (Ministerio de Salud Pública Cuba, 2013).

La exactitud de un método microbiológico es el grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. El parámetro de precisión es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar un procedimiento analítico repetidas veces, bajo unas condiciones ya establecidas, a su vez, dependen solo de la distribución de errores aleatorios y no tiene relación alguna con el valor verdadero o el especificado, el parámetro de precisión se expresa como el coeficiente de variación (Camaro et al., 2015).

Los parámetros mencionados anteriormente son los requeridos por las diferentes normas ISO, Asociación de Colaboración Analítica Oficial (AOAC) y Manual de Análisis Bacteriológicos (BAM), en la realización de una validación secundaria. En este caso, para la detección de microorganismos indicadores de contaminación y patógenos (mesófilos aerobios, mohos y levaduras, coliformes, *E. coli*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus creus*) en alimentos como productos de derivados cárnicos, derivados pesqueros y derivados lácticos, así como bebidas de origen natural-frutal. Para dar cumplimiento con lo estipulado en la NTC-ISO/IEC 17025:2017 y así garantizar resultados confiables y exactos. Teniendo en cuenta, además, lo propuesto en los manuales de buenas prácticas de laboratorio (BPL) y las recomendaciones de los manuales para el control de calidad de alimentos en laboratorios microbiológicos de control expuesto por la FAO (Organización de la Naciones

Unidas para la Alimentación y la Agricultura) para que los laboratorios de análisis se conviertan en entidades de apoyo para las plantas industriales, hoteles, restaurantes y demás establecimientos dedicados al procesamiento y manipulación de alimentos, con el propósito de identificar los peligros que alteran la inocuidad de estos, de tal modo que se puedan prevenir situaciones riesgosas para la salud humana y pérdidas económicas en la industria.

Prevenir la presencia de patógenos es primordial para asegurar la calidad y la seguridad de los alimentos. En la gran mayoría de ocasiones, el motivo de una infección alimentaria es una mala praxis en la manipulación de los alimentos, vegetales que no se lavan de forma adecuada, comida elaborada con manos sucias o una mala higiene de los utensilios de cocina son los factores más destacados, los cuales pueden causar al consumidor infección e intoxicación. Por un lado, la infección se produce por la ingesta de alimentos contaminados con bacterias vivas que entran en el huésped y provocan la enfermedad, mientras que la intoxicación, en cambio, aparece cuando se ingieren alimentos que antes se han contaminado con bacterias que producen toxinas, y estas últimas son las que causan la enfermedad (Gimferrer, 2013).

Por ejemplo, los patógenos más habituales en los alimentos son: *Salmonella* la cual se presenta en alimentos como huevos, aves crudas o poco cocinadas, alimentos ya elaborados que se dejan a temperatura ambiente durante varias horas y aquellos en cuya elaboración se utilizan huevos crudos, como la mayonesa, clara batida o leche con huevo; la *Escherichia coli* se puede encontrar en carne de res cruda o poco cocinada, productos frescos crudos, leche cruda, jugos de fruta sin pasteurizar, agua contaminada o sin un adecuado tratamiento de potabilización; *Listeria monocytogenes* pueden estar en alimentos refrigerados, en alimentos listos para consumir a base de carne de res, pollo o pescado, leche cruda, quesos blandos, verduras con excesivo almacenamiento, productos en conserva o ahumados; *Campylobacter jejuni* se encuentran en

carne de pollo cruda o poco cocinada, leche sin pasteurizar, agua contaminada, pescado crudo o poco cocinado y la *Staphylococcus aureus* se puede presentar en alimentos cocinados ricos en proteínas como jamón cocido y carne de ave, productos de pastelería sobre todo los rellenos de crema, productos lácteos y ensaladas; estos son los microorganismos de mayor interés para la detección en laboratorios de ensayo, ya que son el denominador común de todas las enfermedades de transmisión alimentaria (Sánchez, 2015).

## Metodología

El siguiente proyecto se enmarca en el tipo de investigación aplicada, dado que esta se centra en encontrar mecanismos o estrategias que permitan encontrar un objetivo concreto (Castillero, 2017), el cual es la implementación y validación de métodos microbiológicos para el análisis de alimentos y bebidas en la empresa Laboratorio de Análisis Ambiental del Caribe S.A.S ubicado en la ciudad de Santa Marta-Magdalena, Colombia.

La investigación adopta un diseño cuasi experimental, puesto que este tipo de diseño es una derivación de los estudios experimentales, en los cuales la asignación de los datos no es aleatoria, aunque el factor de exposición es manipulado por el investigador. Estos diseños carecen de un control experimental absoluto de todas las variables relevantes debido a la falta de aleatorización, ya sea en la selección aleatoria de los datos o en la asignación de estos a los grupos experimental y control, los cuales incluyen una preprueba para comparar la equivalencia entre los grupos (Cardona, 2013).

Esta investigación se basa en un enfoque cuantitativo; “se utiliza para la recolección y el análisis de datos de la población para contestar preguntas de investigación y confía en la medición numérica, el conteo y frecuentemente en el uso de la estadística para establecer con exactitud patrones de comportamiento de una población, los cuales permitirán la construcción y la demostración de las teorías a través del razonamiento deductivo” (Anónimo, 2013).

El proyecto se planteó para desarrollarse en tres (3) fases de trabajo en concordancia con los objetivos específicos planteados:

**Fase 1:** Determinación de los agentes microbianos y tipos de alimentos y bebidas de análisis en el laboratorio.

En esta fase se realizó una revisión bibliográfica detallada de los protocolos existentes para la detección de microorganismos patógenos en alimentos y bebidas a través de métodos normalizados propuestos por normas como NTC, ISO, AOAC y BAM. A partir de esta revisión se determinaron en específico los agentes microbianos y los alimentos y bebidas para analizar en el laboratorio, estos fueron seleccionados de acuerdo con las necesidades comerciales y de acuerdo con lo estipulado por la normatividad nacional.

**Fase 2:** Implementación de métodos microbiológicos.

Según la revisión bibliográfica realizada en la fase 1, se adoptaron los métodos para la identificación de microorganismos contaminantes como mesófilos aerobios y microorganismo patógenos como: *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, los cuales fueron documentados mediante instructivos analíticos y técnicos.

Se siguieron los siguientes protocolos descritos a continuación en los diagramas de flujo del proceso:

- ***Determinación de Mesófilos aerobios:***

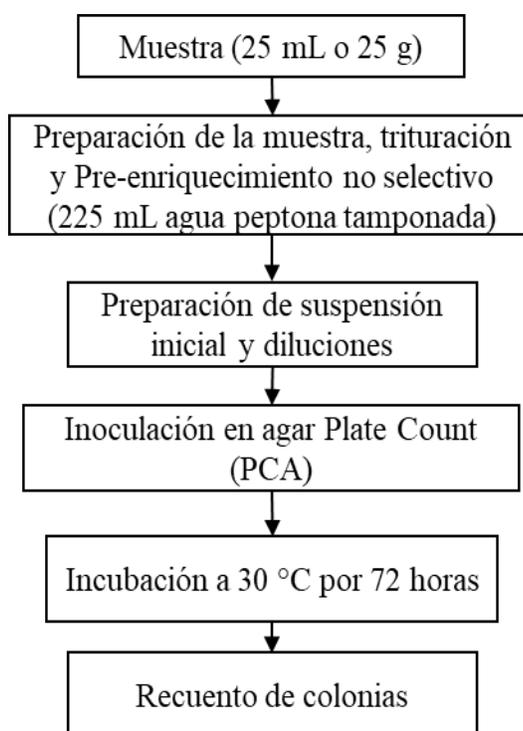
Se tomó una muestra representativa de cada alimento seleccionado en la fase 1 (25 g para alimentos sólidos y 25 ml para bebidas). Posteriormente, se realizó la suspensión inicial y el pre-enriquecimiento en 225 ml de agua peptona tamponada (Neogen – Reino Unido) y se dejó en reposo por un tiempo de 15 minutos. A partir de la suspensión inicial, se procedió con las demás diluciones seriadas de las muestras hasta una concentración de  $10^{-7}$ . Luego, se inoculó 1 ml de cada dilución en Agar Plate Count – PCA (Neogen – Reino Unido) por el método de siembra en profundidad. Las placas fueron incubadas a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $72 \pm 3$  horas en Memmert modelo IN30 calibrado identificado en el laboratorio como IN-ME-01. Después de ese periodo, fue realizado

el conteo de colonias y su respectivo cálculo en unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro de muestra (UFC/g o ml) (ICONTEC, 2009).

El método para mesófilos aerobios fue realizado por duplicado para cada uno de los analistas. En la figura 1 se presenta el diagrama de flujo del proceso para la determinación de mesófilos aerobios de acuerdo con la norma NTC 4519:2009.

### Figura 1

*Diagrama de flujo para la determinación de mesófilos aerobios.*



*Nota.* Adaptado de NTC 4519, Icontec, 2009.

#### - ***Determinación de Salmonella spp.:***

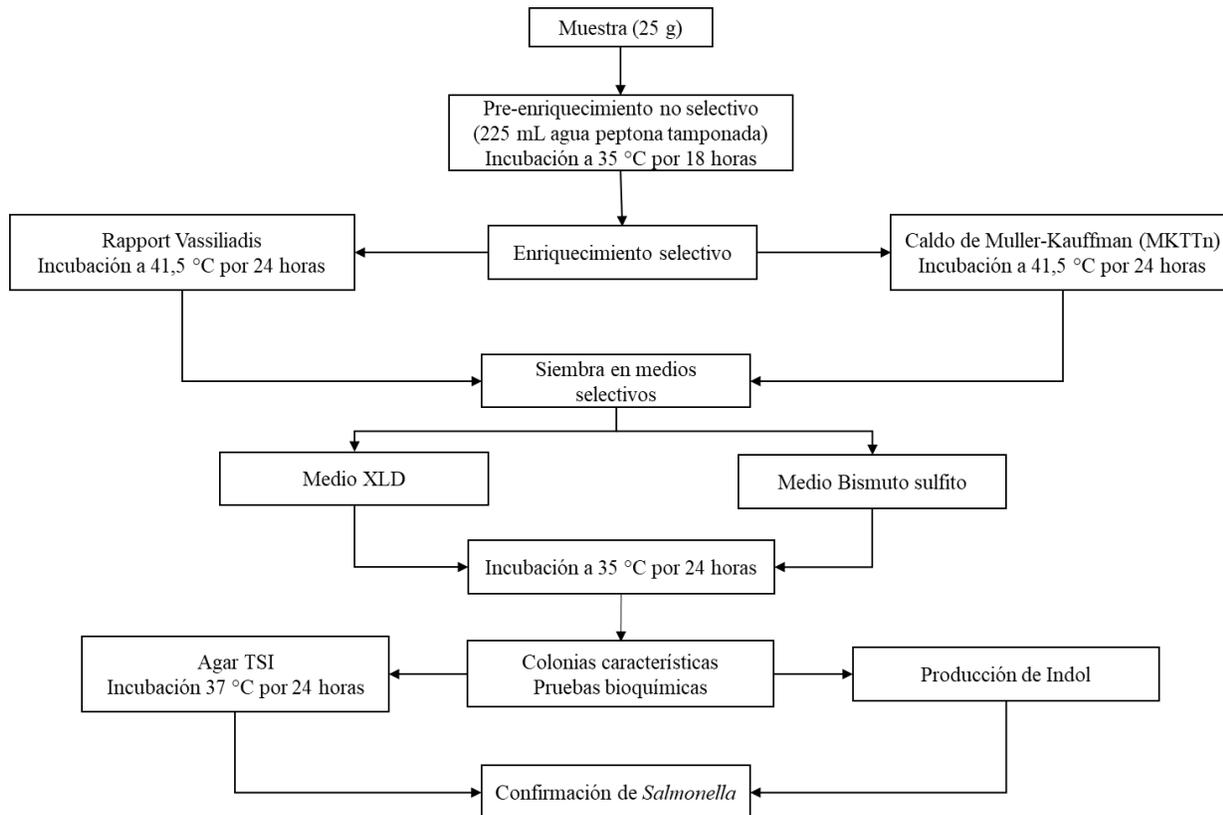
Se tomó una muestra representativa (25 gramos) de cada alimento seleccionado en la fase 1. Posteriormente, se realizó la suspensión inicial y el pre-enriquecimiento en 225 ml de agua peptona tamponada (Neogen – Reino Unido) e incubación a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por  $18\text{ horas} \pm 2\text{ horas}$  en una incubadora marca Memmert modelo IN30 calibrado identificado en el laboratorio como IN-ME-01. Luego, se tomaron 0,1 ml de la suspensión inicial para realizar el enriquecimiento en

medio selectivo líquido Rappaport Vassiliadis (Acumedia, Neogen – Reino Unido) y 1 ml de la suspensión inicial para el enriquecimiento en medio Tetrionato Mueller Kauffman (Scharlau – España), la incubación se realizó a 41.5 °C durante 24 horas en incubadora marca ThermoScientific calibrado identificado como IN-TS-01. Transcurrido el tiempo de incubación, se procede a realizar la siembra por agotamiento en medio selectivo sólido agar Xilosa Lisina Desoxicolato (Merck – USA) y agar Bismuto Sulfito (Acumedia, Neogen – Reino Unido), la incubación se llevó a cabo a 35 °C durante 24 horas en el equipo IN-ME-01. Finalmente se procede a realizar la confirmación, en el cual se subcultivan las colonias de *Salmonella* spp., presuntivas aisladas y se confirman mediante ensayos bioquímicos empleando Agar Hierro-Triple Azúcar (Scharlau – España) y mediante la producción de Indol en el que se utiliza agua peptonada tamponada y reactivo de Kovacs (Scharlau – España) (ICONTEC, 2007).

El método para *Salmonella* spp. fue realizado por duplicado para cada uno de los analistas. La figura 2 presenta el diagrama de flujo del protocolo para la determinación de *Salmonella* de acuerdo con la norma NTC 4574:2007.

**Figura 2**

*Diagrama de flujo para la determinación de Salmonella.*



*Nota.* Adaptado de NTC 4574, Icontec, 2007.

- ***Determinación de Escherichia coli:***

Se tomó una muestra representativa de cada alimento seleccionado en la fase 1 (50 g para productos sólidos). Posteriormente se realizó la suspensión inicial y el pre-enriquecimiento en 450 mL de agua peptonada tamponada y se dejó en reposo durante 15 minutos. A partir de la suspensión inicial, se procedió con la preparación de las demás diluciones seriadas de las muestras hasta una concentración de  $10^{-7}$ . Luego, se inoculó 1 mL de cada dilución en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo Lauryl Triptosa (Scharlau – España) y se incubó a 35 °C durante 24 a 48 horas Memmert modelo IN30 calibrado identificado en el laboratorio como IN-ME-01 para su prueba presuntiva. Después de este periodo, fue realizada la examinación de tubos tomando como positivos aquellos que presentaron fermentación de la muestra. Posteriormente, se realizó

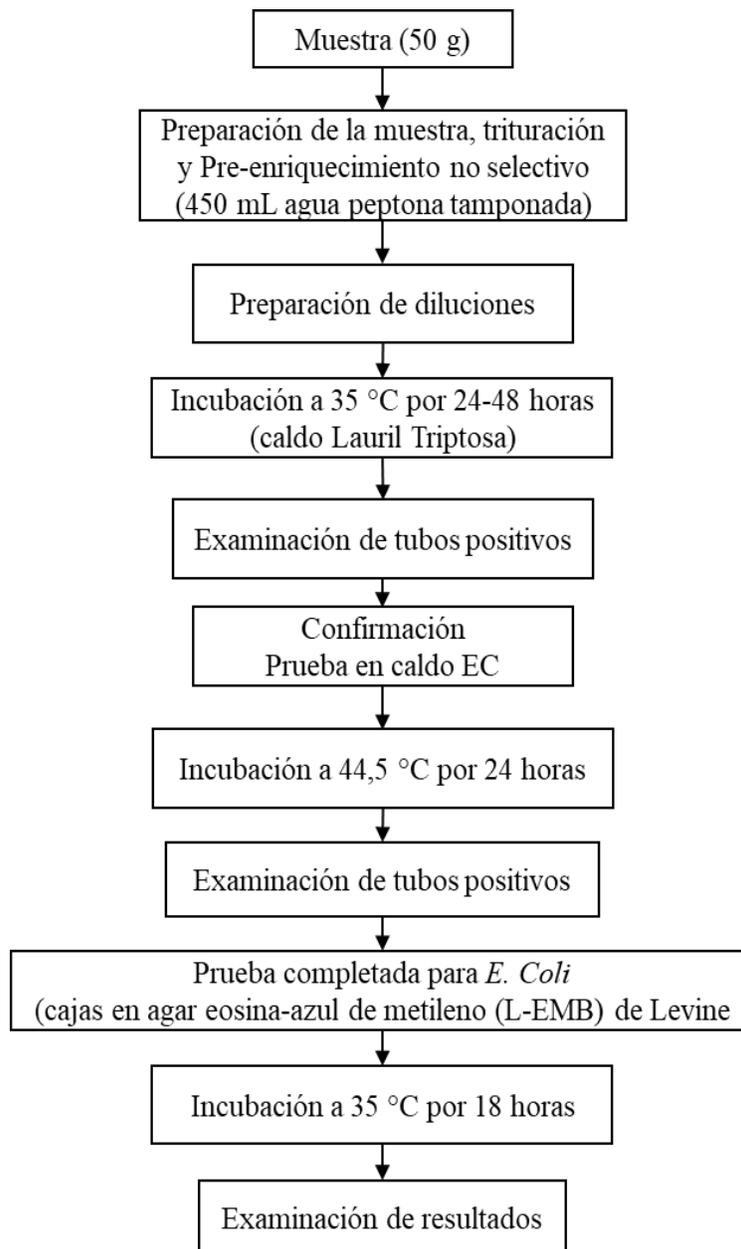
la prueba confirmativa, la cual consistió en la inoculación de 1 mL de la muestra del tubo que resulto positivo en la fase anterior en 10 mL de caldo EC (Scharlau – España) y se incubo a 44.5 °C durante 24 horas en ThermoScientific calibrado identificado como IN-TS-01. Luego, se realizó nuevamente la examinación de estos en busca de tubos positivos, los cuales, a su vez, fueron aplicados a una prueba completada en la que se tomó una porción de la muestra mediante una asada, se sembró mediante la técnica de agotamiento en cajas con Agar Eosina-Azul de metileno de Livine (Neogen – Reino Unido) y se incubo a 35 °C por 18 horas para la confirmación de la presencia de *E. coli* en las muestras, dando un crecimiento característico de color de verde metálico brillante. Finalmente, a partir de los tubos positivos obtenidos en la etapa de confirmación se calculó el Numero Mas Probable por gramo de muestra (NPM/g) (Feng et al., 2020).

Cabe resaltar que para la mayoría de los alimentos se aplica la prueba de NPM de 3 tubos en diluciones de 10, 1 y 0.1 mL de inculo, mientras que, para productos de mar como pescados y mariscos, se recomienda la utilización de la prueba de NPM de 5 tubos en diluciones de 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 mL de inculo, de cada concentración realizada.

Adicionalmente, el método para la determinación de *E. coli* fue realizado por duplicado para cada uno de los analistas. En la figura 3 se presenta el diagrama de proceso para la determinación de *E. coli* coagulasa positiva de acuerdo con la norma BAM Capitulo 4.

**Figura 3.**

Diagrama de flujo para la determinación de *E. coli*.



Nota. Adaptado de *BAM capítulo 4, Manual de Analisis Bacteriológico, 2022.*

- ***Determinación de Staphylococcus aureus Coagulasa Positiva:***

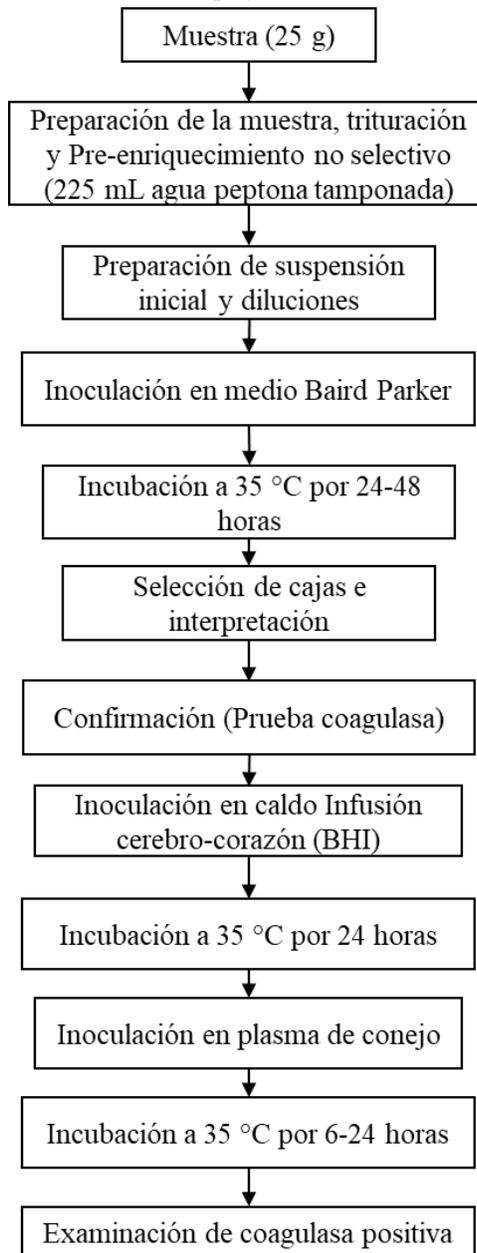
Para la aplicación de esta metodología se tomó una muestra representativa de cada alimento seleccionado en la fase 1 (25 g para productos sólidos), al cual se le realiza un pre-enriquecimiento con 225 mL de agua peptona tamponada y se deja en reposo durante 15 minutos

para obtener una suspensión inicial. A partir de esta suspensión se preparan las demás diluciones seriadas de las muestras hasta una concentración de  $10^{-7}$ . Luego, se inoculó 1 mL de cada dilución en placas con medio Agar Baird Parker (Neogen – Reino Unido) empleando la técnica de siembra en superficie. Estas cajas fueron incubadas a una temperatura de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 y 48 horas en una incubadora marca Memmert modelo IN30 calibrado identificado en el laboratorio como IN-ME-01. Terminado el tiempo de incubación, se seleccionaron las cajas con crecimiento de colonias típicas, atípicas o ambas de *Staphylococcus aureus* y se realizó el conteo de acuerdo con cada tipo de colonia para su respectivo calculo en unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (UFC/g), teniendo en cuenta que las colonias típicas son redondas de color negro brillante con un halo claro y las colonias atípicas por lo general son de color gris o no presentan un halo alrededor de ellas. Posteriormente, con un asa estéril se tomaron de 3 a 5 colonias por cada caja seleccionada ya sea típica, atípica o ambas para la confirmación de la coagulasa, las cuales fueron inoculadas e incubadas en tubos de ensayo con 10 mL de caldo Infusión Cerebro-Corazón (Neogen – Reino Unido) a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas en la incubadora utilizada anteriormente. Luego, se sembraron 0.3 mL de la muestra anterior en un tubo eppendorf con 0.5 mL de plasma de conejo. Seguido, se procedió a incubar a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de 6 a 24 horas. Finalmente, se examina el resultado dando positivo a cualquier grado de coagulación en la muestra (ICONTEC, 2007).

El método para la determinación de *Staphylococcus aureus* fue realizado por duplicado para cada uno de los analistas. En la figura 4 se presenta el diagrama de proceso para la determinación de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva de acuerdo con la norma NTC 4779:2007.

**Figura 4.**

*Diagrama de flujo para la determinación de Staphylococcus aureus coagulasa positiva.*



*Nota.* Adaptado de NTC 4779. Icontec, 2007.

### **Fase 3:** Protocolo de validación de métodos.

En esta fase se estableció un protocolo de validación que concuerde con los requisitos exigidos para la estandarización de los métodos microbiológicos normalizados teniendo en cuenta cada una de las etapas que esta exige según la norma NTC-ISO/IEC 17025:2017.

- ***Etapa 1:***

Creación de un plan de validación en el que se contempla el alcance de la validación, el diseño experimental, materiales, equipos y reactivos; y metodología de los ensayos a realizar.

- ***Etapa 2:***

Proceso de validación de acuerdo con lo estipulado en la etapa 1, el cual se realizó de la siguiente manera:

1. Se realizaron actividades previas en las que se incluye el lavado y esterilización del material de vidrio y fueron sometidos a control de acuerdo con lo establecido en el laboratorio, se estipulo la cantidad de soluciones y reactivos a utilizar en los ensayos, al igual que la cantidad de “muestras” y estándares necesarios para llevar a cabo el proceso. Además, verificar que todos los materiales, reactivos y medios de cultivo estén disponibles en el laboratorio.
2. Dentro de las actividades previas también se incluyó, monitoreo ambiental, esterilización y control de esterilidad de los medios de cultivo, control de esterilidad del líquido de disolución y estandarización del inóculo.
3. Se preparan estándares con cepas microbianas certificables cualitativas en diferentes niveles de concentración (estándar bajo, medio, alto) que puedan abarcar un amplio rango de trabajo.
4. Por día se analizó un grupo básico de “muestras” que estaría conformado por estándares (bajo, medio, alto) y las muestras naturales (alimentos: carnes, pollo, pescados y mariscos, y jugos naturales), el cual analizó mínimo por duplicado. En el caso de las muestras naturales se realizaron siete (7) mediciones por duplicado cada analista, teniendo en cuenta el

protocolo de cada método, por lo que cada día se analizaron un solo tipo de muestra natural, es decir, por día se analizaron los estándares y un tipo de producto alimenticio.

5. La validación se realizó mínimo con dos analistas capacitados.

6. El formato de captura de datos se diligenció en el mismo instante en que se obtienen (no transcribir, copiar, etc.). Las correcciones se fueron realizadas inmediatamente dejando constancia por parte del analista en que consistió la corrección.

- ***Etapa 3:***

Informe de validación a partir de los datos obtenidos y el análisis de estadístico de estos para determinar la precisión, exactitud, selectividad, especificidad y sensibilidad de los métodos.

Los datos obtenidos durante el desarrollo de los experimentos fueron analizados en Excel, en donde los datos se convirtieron a valores logarítmicos para la normalidad y linealidad estos, a partir de ello se calcula la desviación estándar, desviación estándar relativa (RSD), coeficiente de variación y porcentaje de recuperación para la determinación de repetibilidad, repetibilidad intermedia, precisión y veracidad de los métodos, además se realizó una prueba F para determinar si existen diferencias entre las varianzas de una muestra y a partir de ella realizó una prueba T para determinar si existen diferencia entre las medias entre los datos obtenidos entre los analistas, teniendo en cuenta un porcentaje de confianza del 95% a un nivel de significancia  $\alpha \leq 0,05$ , esto para los métodos cuantitativos (determinación mesófilos aerobios, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva y *Escherichia coli*).

Para los métodos cualitativos como la detección de *Salmonella* se tuvo en cuenta como criterio de aceptación valores superiores al 90% en los parámetros de sensibilidad basado en los resultados positivos de las muestras, especificidad de acuerdo con los resultados de muestras negativas (especialmente muestras estándar) y la eficiencia.

## Resultados y discusión

### Fase 1: Determinación de los agentes microbianos que se detectaron y el tipo de alimento y bebidas que se analizaron en el laboratorio

De acuerdo con una revisión minuciosa en los últimos 3 años de los clientes que han solicitado realización de análisis microbiológicos para la determinación de la calidad de los alimentos preparados y/u ofrecidos al consumidor final, se escogieron muestras de alta influencia en el laboratorio y con mayor susceptibilidad a contaminación por microorganismos causantes de ETAs, tales como: carnes (crudas, cocidas, procesadas, curadas), pollo, pescados, mariscos y jugos naturales.

A partir de lo anterior, los microorganismos seleccionados en la detección de los alimentos anteriormente mencionados se realizaron de acuerdo con las exigencias establecidas por el Ministerio de Salud y Protección Social en sus diferentes resoluciones y las Normas Técnicas Colombianas (NTC), las cuales mencionan lo siguiente:

- ***NTC 1325 de 2008 Industrias Alimentarias***

Productos Cárnicos Procesados No Enlatados. Esta norma establece los requisitos que deben cumplir los productos cárnicos procesados no enlatados, no se aplica a productos a base de pescado, mariscos o crustáceos crudos y análogos cárnicos. A continuación, en la tabla 1, 2 y 3 se presentan los requisitos microbiológicos exigidos para dichos productos:

**Tabla 1**

*Requisitos microbiológicos para productos cárnicos procesados cocidos*

<b>Requisito</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>c</b>
Recuento de aerobios mesófilos, UFC/g	3	-	100000	1
Recuento de coliformes UFC/g	3	100	500	1
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva, UFC/g	3	<100	-	-
Recuento de esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor, UFC/g	3	<10	100	1
Detección de <i>Salmonella</i> , /25 g	3	Ausencia	-	-
Detección de <i>Listeria Monocytogenes</i> , /25 g	3	Ausencia	-	-
Recuento de <i>Escherichia Coli</i> /g	3	<10	-	-

*Nota.* Adaptado NTC 1325, Icontec, 2008.

**Tabla 2**

*Requisitos microbiológicos para productos cárnicos procesados crudos frescos congelados o no*

<b>Requisito</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>c</b>
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva, UFC/g	3	100	300	1
Recuento de esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor, UFC/g	3	100	300	1
Detección de <i>Salmonella</i> , /25 g	3	Ausencia	-	-
Recuento de <i>Escherichia Coli</i> /g	3	100	400	1

*Nota.* Adaptado NTC 1325, Icontec, 2008.

**Tabla 3**

*Requisitos microbiológicos para productos cárnicos procesados crudos madurados o fermentados o acidificados o los dos o los tres*

<b>Requisito</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>c</b>
Recuento de coliformes UFC/g	3	<10	200	1
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva, UFC/g	3	<100	-	-
Recuento de esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor, UFC/g	3	<10	100	1
Detección de <i>Salmonella</i> , /25 g	3	Ausencia	-	-
Detección de <i>Listeria Monocytogenes</i> , /25 g	3	Ausencia	-	-
Recuento de <i>Escherichia Coli</i> /g	3	<10	-	-

*Nota.* Adaptado NTC 1325, Icontec, 2008.

- **NTC 3644-2 de 1998 Industrias Alimentarias**

Pollo Beneficiado. Esta norma establece los requisitos que debe cumplir y los métodos de ensayo a los cuales debe someterse el pollo beneficiado para su consumo humano. A continuación, en la tabla 4 se presentan los requisitos microbiológicos exigidos para dichos productos:

**Tabla 4**

*Requisitos microbiológicos del pollo beneficiado, pollo en canal*

<b>Requisito</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>c</b>
NPM de coliformes fecales/g	5	100	1100	1
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva, UFC/g	5	100	500	1
Recuento de esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor, UFC/g	5	100	1000	1
Detección de <i>Salmonella</i> , /25 g	5	0	-	0
Detección de <i>Listeria Monocytogenes</i> , /25 g	3	Ausencia	-	-
En donde: 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 aceptable de calidad c = número de muestras permitidas con resultados entre m y M				

*Nota.* Adaptado NTC 3644-2, Icontec, 1998.

- **Resolución 00402 de 2002 del Ministerio de Salud**

Por lo cual se establecen los requisitos para la comercialización de las aves beneficiadas enteras, despresadas y/o deshuesadas que se someten a la técnica de marinado. A continuación, en la tabla 5 se presentan los requisitos microbiológicos exigidos para dichos productos:

**Tabla 5**

*Requisitos microbiológicos para la comercialización de aves benéficas enteras, despresadas y/o deshuesadas que se someten a marinado*

<b>Requisito</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>c</b>
NPM de coliformes fecales/g	3	500	1100	1
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva/g	3	100	1000	1
Recuento de esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor, UFC/g	3	100	1000	1
En donde: 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 aceptable de calidad c = número de muestras permitidas con resultados entre m y M				

*Nota.* Adaptado Resolución 00402, Ministerio de Salud, 2002.

- ***Resolución 7992 de 1991 del Ministerio de Salud***

Por el cual se reglamenta parcialmente el Título V de la Ley 09 de 1979 en lo relacionado con la elaboración y comercialización de jugos, concentrados, néctares, pulpas, pulpas azucaradas y refrescos de frutas. A continuación, en la tabla 6, 7, 8 y 9 se presentan las características microbiológicas exigidos para dichos productos:

**Tabla 6**

*Características microbiológicas de los jugos y pulpas de frutas congeladas*

<b>Requisito</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>
Recuento de aerobios mesófilos, UFC/g	3	20.000	50.000
NPM coliformes totales/g	3	9	29
NPM coliformes fecales/g	3	<3	-
Recuento de esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor/g	3	<10	-
Recuento de hongos y levaduras/g	3	1.000	3.000

*Nota.* Adaptado Resolución 7992, Ministerio de Salud, 1991.

**Tabla 7**

*Características microbiológicas de los jugos y pulpas de frutas pasteurizados*

<b>Requisito</b>	<b>n</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>c</b>
------------------	----------	----------	----------	----------

Recuento de aerobios mesófilos, UFC/g	3	20.000	3.000	1
NPM coliformes totales/g	3	9	-	0
NPM coliformes fecales/g	3	<3	-	0
Recuento de esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor/g	3	<10	-	0
Recuento de hongos y levaduras/g	3	100	200	1

*Nota.* Adaptado *Resolución 7992*, Ministerio de Salud, 1991.

### Tabla 8

*Características microbiológicas de los refrescos de frutas higienizadas con duración máxima de 30 días*

Requisito	n	m	M	c
Recuento de aerobios mesófilos/cm <sup>3</sup>	3	1.000	3.000	1
NPM coliformes totales/cm <sup>3</sup>	3	9	29	1
NPM coliformes fecales/cm <sup>3</sup>	3	<3	-	0
Recuento de esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor/g	3	<10	-	0
Recuento de hongos y levaduras/cm <sup>3</sup>	3	100	200	1

*Nota.* Adaptado *Resolución 7992*, Ministerio de Salud, 1991.

### Tabla 9

*Características microbiológicas de los refrescos de frutas higienizadas con duración mayor de 30 días*

Requisito	n	m	M	c
Recuento de aerobios mesófilos/cm <sup>3</sup>	3	100	300	1
NPM coliformes totales/cm <sup>3</sup>	3	<3	-	1
NPM coliformes fecales/cm <sup>3</sup>	3	<3	-	0
Recuento de esporas <i>Clostridium</i> sulfito reductor/g	3	<10	-	0
Recuento de hongos y levaduras/cm <sup>3</sup>	3	10	100	1

*Nota.* Adaptado *Resolución 7992*, Ministerio de Salud, 1991.

- ***Resolución 000122 de 2012 del Ministerio de Salud y Protección Social***

Por el cual se modifica parcialmente la Resolución 0776 de 2008, mediante el entonces el Ministerio de la Protección Social, se estableció el reglamento técnico sobre los requisitos fisicoquímicos y microbiológicos que deben cumplir los productos de la pesca, en particular

pescados, moluscos y crustáceos para consumo humano. A continuación, en la tabla 10 se presentan los requisitos microbiológicos exigidos para dichos productos:

**Tabla 10**

*Requisitos microbiológicos para productos de la pesca*

<b>Productos de la pesca, en particular pescados, moluscos y crustáceos frescos, ultracongelados y congelados crudos</b>				
<b>Parámetros</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>c</b>
Recuento de <i>Escherichia Coli/g</i>	5	10	400	2
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva/g	5	100	1000	2
Detección de <i>Salmonella</i> , /25 g	5	Negativo	-	0
Detección <i>Vibrio cholerae</i> O1/25g	5	Negativo	-	0
<b>Productos de la pesca, en particular pescados, moluscos y crustáceos precocidos</b>				
<b>Parámetros</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>c</b>
Recuento de <i>Escherichia Coli/g</i>	5	10	100	2
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva/g	5	100	1000	2
Detección de <i>Salmonella</i> , /25 g	5	Negativo	-	0
Detección <i>Vibrio cholerae</i> O1/25g	5	Negativo	-	0
<b>Productos de la pesca, en particular pescados, moluscos y crustáceos pasteurizados o cocidos</b>				
<b>Parámetros</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>c</b>
Recuento de <i>Escherichia Coli/g</i>	5	10	100	2
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva/g	5	100	1000	2
Detección de <i>Salmonella</i> , /25 g	5	Negativo	-	0
Detección <i>Vibrio cholerae</i> O1/25g	5	Negativo	-	0
<b>Productos de la pesca, en particular pescados, moluscos y crustáceos en conservas – Esterilidad comercial</b>				
<b>Parámetros</b>	<b>n</b>			
Recuento Microorganismos aerobios y anaerobios	5	Prueba de esterilidad comercial: No presentar crecimiento bacteriano		
En donde:				
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 aceptable de calidad				
c = número de muestras permitidas con resultados entre m y M				

*Nota.* Adaptado Resolución 000122, Ministerio de Salud y Protección Social, 2012.

Dicho lo anterior, el Laboratorio de Análisis Ambiental del Caribe S.A.S, ha seleccionado los siguientes microorganismos indicadores de contaminación y patógenos para detectar en los subsecuentes productos alimentarios, de acuerdo con la frecuencia con que son solicitados por los clientes y a los requisitos exigidos en las normas mencionadas anteriormente, los cuales son:

- Mesófilos aerobios
- *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva
- *Escherichia Coli*
- *Salmonella* spp.

A continuación, en la tabla 11 se presenta los alimentos seleccionados para el proceso y los microorganismos a detectar en cada uno de ellos, teniendo en cuenta que el alcance de cada uno de los métodos es amplio para el análisis de todos los alimentos destinados para consumo humano y animal:

**Tabla 11**

*Productos alimenticios y microorganismos escogidos para la validación*

Productos Alimenticios	Microorganismos indicadores de contaminación y patógenos			
	Mesófilos	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Salmonella</i>
Carne cruda: Carne molida	X	X	X	X
Carne procesada cocida: Jamón	X	X	X	X
Pollo: Pechuga de pollo	X	X	X	X
Pescado fresco crudo	X	X	X	X
Mariscos precocidos	X	X	X	X
Jugos naturales: Jugo de naranja	X	-	-	-

Los alimentos mencionados anteriormente en la tabla 11 fueron seleccionados debido a su alta demanda de consumo. Los productos como la carne molida, la pechuga de pollo y el pescado fresco provienen de la distribución al por mayor y al detal, especialmente a entidades dedicadas a la transformación de alimentos como los restaurantes. Las muestras se tomaron en recipientes estériles cumpliendo con los protocolos de refrigeración para mantener las condiciones de las muestras.

En cuanto a las muestras de jamón y mariscos precocidos, estas fueron adquiridas a través de almacenes de cadena por lo que vienen empacadas al vacío y a una temperatura establecida, la cual se mantuvo. Por otra parte, el jugo de naranja fue adquirido directamente a una empresa dedicada a la fabricación y distribución al detal y al por mayor envasado en botellas de plástico en diferentes volúmenes de presentación y para un consumo inferior a 24 horas.

En la tabla 12, se presentan los métodos a implementados para la detección de los microorganismos de acuerdo a los recursos del laboratorio (estructura, personal, equipos, etc.), a lo sugerido por los manuales para el control de alimentos en laboratorios microbiológicos de control de la FAO y la GTC 125:2005 “Guía de referencias de métodos horizontales de análisis microbiológicos para bebidas, alimentos y alimentos para animales”, la cual brinda información sobre los métodos horizontales propuestos por diferentes entidades oficiales para el análisis de los alimentos y los criterios mínimos que todos los laboratorios deberían considerar al establecer sus técnicas de análisis.

**Tabla 12**

*Métodos para implementar para la detección de microorganismo*

Microorganismo	Entidad Oficial	Principio de la Técnica	Método	Alimentos	Expresión de los resultados
Mesófilos aerobios	ICONTEC	Recuento en placa	NTC 4519 / ISO 4833	Todos los alimentos	Conteo: 30 – 300 UFC Reportar como: UFC/g
<i>Salmonella</i> spp		Detección	NTC 4574	Alimentos de consumo humano y para animales	Presencia o ausencia de <i>Salmonella</i> en 25 g de producto
<i>Staphylococcus aureus</i>		Recuento en placa	NTC 4779	Todos los alimentos	Conteo: 20 – 200 colonias
<i>Escherichia Coli</i>	FDA / BAM	Número Más Probable (NPM)	Capítulo 4	Todos los alimentos	NPM de <i>E. Coli</i> /g o mL

## **Fase 2: Implementación de métodos microbiológicos**

Se implementaron los métodos microbiológicos establecidos en la fase 1 y de acuerdo con los diagramas de flujo descritos en la metodología, los cuales son documentados mediante instructivos analíticos y técnicos acordes con los requerimientos de calidad establecidos en el Laboratorio de Análisis Ambiental del Caribe S.A.S y teniendo en cuenta sus recursos.

Dichos instructivos se encuentran disponibles de forma física y magnética en los repositorios del laboratorio para sus empleados bajo la siguiente identificación:

- GO-IT-086: Método Horizontal para el Recuento de Microorganismos. Técnica de Recuento de Colonias a 30 °C
- GO-IT-087: Método Horizontal para el Recuento de *Staphylococcus aureus* Coagulasa Positiva.

- GO-IT-088: Enumeración de *Escherichia Coli* y Bacterias Coliforme. Técnica de Número Más Probable.

- GO-IT-089-: Método Horizontal para la Detección de *Salmonella* spp.

Se tuvieron cuenta los siguientes recursos presentados en la tabla 13 para llevar a cabo el proceso de implementación y validación:

**Tabla 13**

*Recursos necesarios para la implementación y validación de los métodos*

<b>Materiales y Equipos</b>	<b>Soluciones, reactivos y medios</b>	<b>Entorno</b>	<b>Personal</b>
Cabina de bioseguridad de flujo laminar Autoclave Incubadora con capacidad de operar a 30, 35, 37, 41.5 y 44.5 °C Refrigerador a 4 °C Congelador -15 °C Horno de secado a 170 °C Medidor de pH sensibilidad de ± 0,1 Balanza analítica sensibilidad de ± 0,1 Licuadora con vaso de vidrio y cuchillas en acero (esterilizable a 121 °C por 15 min) Cronometro Contador de colonias Micropipetas de 1-1000 µL (dos unidades para cada rango de medida) Pipetas graduadas de 1 – 10 mL (dos unidades para cada rango de medida) Probeta de 50, 100, 250 y 500 mL de vidrio esterilizadas (dos unidades para cada medida)	Tubo #5 de la escala de McFarland Cepa certificada ATCC 25923- <i>Staphylococcus aureus</i> (3 pasos de referencia) Cepa certificada ATCC 14028 - <i>Salmonella</i> entérica <i>Thyphimurum</i> (3 pasos de referencia) Cepa certificada ATCC 43888- <i>E. Coli</i> ( 3 pasos de referencia) Agua grado reactivo Agua peptonada tamponada 1000 g Solución salina 0,9% Alcohol 96% 4000 mL Medio Baird Parker 500 g Caldo Infusión Cerebro-Corazón 500 g Plasma de conejo 6 frascos de 3 mL Caldo Bilis Verde Brillante 500 g Caldo Lauryl Triptosa 500 g Caldo EC 500 g Agar Eosina-Azul de metileno de Livine (L-EMB) 500 g Agar Plate Count 1000 g Medio Rappaport Vassiliadis (RVS) 500 g Medio Tetratonate Mueller Kauffman 500 g	Laboratorio de Análisis Ambiental del Caribe S.A.S.	Muestreador Analista del área de microbiología Coordinador del laboratorio Jefe de calidad Director técnico

<p>Bolsas estériles para almacenamiento de muestra (paquete de 500 unidades) Frascos estériles de 300 (12 unidades) y 500 mL (20 unidades) Tubos tapa rosca estériles 16x160 (300 unidades) Cajas de Petri pequeñas (100 unidades) Cajas de Petri grandes (300 unidades) Campanas Durham (500 unidades) Pipeteador Gradillas (10 unidades) Asas bacteriológicas (20 unidades) Luz UV para esterilización y desinfección de ambientes.</p>	<p>Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) 500 g Agar Bismuto Sulfito 500 g Medio TSI 500 g Reactivo de Kovacs 100 mL</p>		
---	---	--	--

### **Fase 3: Protocolo de validación de métodos**

Se estableció un protocolo de validación que concuerde con los requisitos exigidos para la estandarización de los métodos microbiológicos normalizados teniendo en cuenta cada una de las etapas que esta exige según la norma NTC-ISO/IEC 17025:2017. El proceso de validación está basado en las diferentes guías establecidas en el laboratorio para la validación de métodos fisicoquímicos y microbiológicos, la cual consta de las siguientes etapas: plan de validación, desarrollo de parámetros de validación, evaluación de resultados e informe de validación.

Las cepas de referencia utilizadas en el proceso fueron obtenidas del banco de cepas de trabajo del Laboratorio de Análisis Ambiental del Caribe del área de microbiología, las cuales a su vez fueron adquiridas a proveedores autorizados para la producción de material de referencia, en este caso a BRUKER Analytical Solutions, cepas cualitativas de tercer paso.

Para el control de calidad de los medios de cultivo se realizaron pruebas ecometrías teniendo en cuenta lo propuesto por la guía GTC 171:2008 “Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Guía para la preparación y producción de medios de cultivo. Guía general para los ensayos de desempeño de medios de cultivo”, con ello se determina el nivel de productividad y selectividad de acuerdo con el Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) calculado, dando las siguientes consideraciones presentes en la tabla 14:

**Tabla 14**

*Consideraciones para determinar el nivel de productividad y selectividad de los medios de cultivo*

<b>Prueba de productividad</b>		<b>Prueba de Selectividad</b>	
ICA	Productividad	ICA	Selectividad
4,5 - 6	Alta	4,5 - 6	No hay selectividad
2,5 - 4,5	Media	2,5 - 4,5	Baja
<2,5	Poca	<2,5	Media
0	no productivos	0	Alta

*Nota.* Adaptado de *GTC 171*, Icontec, 2008.

Es preciso tener en cuenta que para llevar cabo en el laboratorio la determinación de cada método se debe de seguir de manera rigurosa el protocolo descrito en los instructivos analíticos, ya que los análisis microbiológicos son susceptibles a factores como manipulación de la muestra, tiempos de agitación, triturado y homogenización, pipeteo de las diluciones, entre otros.

Es de vital importancia asegurarse de la limpieza y esterilización de todos los materiales y equipos con los que se va a trabajar, especialmente del ambiente en donde se realizan los procesos para evitar la contaminación cruzada al momento de realizar los análisis.

Los datos obtenidos durante el desarrollo de los experimentos se analizaron en Excel, en donde los datos se convirtieron a valores logarítmicos para la normalidad y linealidad estos, a partir de ello se calcula la desviación estándar, desviación estándar relativa (RSD), coeficiente de variación y porcentaje de recuperación para la determinación de repetibilidad, repetibilidad intermedia, precisión y veracidad de los métodos, además se realizó una prueba F para determinar si existen diferencias entre las varianzas de una muestra y a partir de ella realizó una prueba T para determinar si existen diferencia entre las medias entre los datos obtenidos entre los analistas, teniendo en cuenta un porcentaje de confianza del 95% a un nivel de significancia  $\alpha \leq$

0,05, esto para los métodos cualitativos (determinación mesófilos aerobios, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva y *Escherichia coli*).

Para los métodos cualitativos como la detección de *Salmonella*, los datos obtenidos fueron organizados en tablas de 2x2 o tabla de contingencia que permite la diferenciación de las muestras en 2 categorías, positivo/negativo y estableciendo una comparación respecto al resultado entre la etapa presuntiva y confirmatoria como se muestra en la figura 15 de acuerdo a lo expuesto por la “Guía de validación de métodos cualitativos para el análisis microbiológico” del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS, 2015), por lo que, a partir dichos datos se calculan los parámetros de sensibilidad basado en los resultados positivos de las muestras, especificidad de acuerdo con los resultados de muestras negativas (especialmente muestras blanco o de control) y la eficiencia, teniendo en cuenta como criterio de aceptación valores superiores al 90%.

### Tabla 15

*Tabla de contingencia para la expresión de resultados cualitativos*

Resultado de ensayos		Resultado confirmado	
		Positivo	Negativo
Resultado presuntivo	Positivo	VP	FP
	Negativo	FN	VN

*Nota.* Adaptado de *Validación de métodos cualitativos para analisis microbiologico*, Instituto Nacional de Salud, 2015.

Donde:

VP = Número de muestras positivas, caracterizadas como tal, verdaderos positivos

FN = Número de muestras positivas, caracterizadas como negativas, falsos negativos

VN = Número de muestras negativas, caracterizadas como tal, verdaderos negativos

FP = Número de muestras negativas, caracterizadas como positivas, falsos positivos

A continuación, se presenta un resumen de los resultados obtenidos de la verificación de validación de cada uno de los métodos con las especificaciones respectivas para el análisis y la obtención de estos:

- ***Verificación de validación del método para la determinación de microorganismos Mesófilos aerobios***

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en la Norma Técnica Colombiana NTC 4519:2009.

Las muestras fueron tomadas al azar cuya procedencia es anónima siguiendo las directrices planteadas por el laboratorio establecidas en el documento GO-IT-018 “Toma, manejo y recepción de muestras”, las cuales fueron ingresadas e identificadas de la siguiente manera:

- M1: Muestra natural de carne cruda (ALI-1547M-0921)
- M2: Muestra natural de pollo (ALI-1548M-0921)
- M3: Muestra natural de carne procesada cocida (ALI-1549M-0921)
- M4: Muestra natural de pescado fresco crudo (ALI-1605M-0921)
- M5: Muestra natural de mariscos (ALI-1606M-0921)
- M6: Muestra natural de jugo natural (ALI-1621M-0921)

La porción de ensayo, suspensión y diluciones iniciales se realizaron teniendo en cuenta lo descrito en las normas NTC 4491-1:2005, NTC 4491-2:2004 y NTC 4491-3:2004; y en lo estipulado en los instructivos analíticos del laboratorio para la metodología (GO-IT-086). Se realizaron diluciones seriadas en base 10 (obteniendo así las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  hasta  $10^{-7}$ ), esto con el fin de disminuir la carga microbiológica de la muestra para hacerla cuantificable.

Se estableció como cepa de referencia el microorganismo *E. Coli* ATCC 43888, teniendo en cuenta que en un medio de enriquecimiento como el Agar Plate Count cualquier microorganismo puede crecer. Como controles de calidad se realizaron pruebas ecometrías para determinar la productividad, ya que en este caso no se aplica la realización de la prueba de selectividad puesto que se trata de un medio de enriquecimiento más no selectivo para un microorganismo en específico; además, también se realiza control del agua destilada estéril utilizado en la preparación de todos los reactivos y medios de cultivo obteniendo los siguientes resultados como se muestran en la tabla 16 y en la figura 5, teniendo en cuenta lo propuesto por la guía GTC 171:2008 para la determinación de resultados y el nivel de productividad de dicho medio:

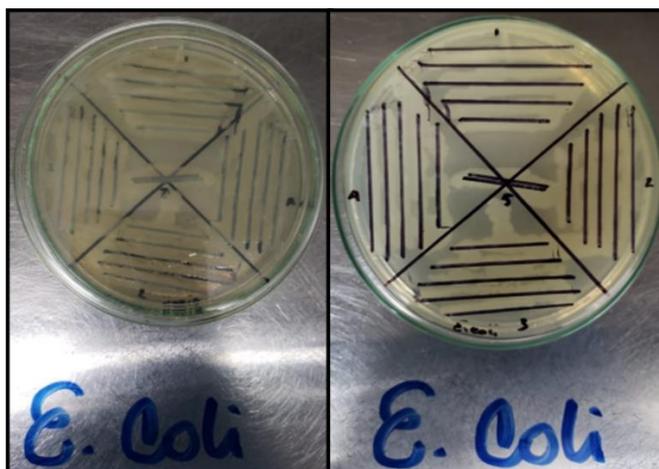
**Tabla 16**

*Resultados prueba Ecometría del medio de cultivo Agar Plate Count para el del Método Horizontal para el Recuento de Microorganismos*

Fecha	Julio 2023	Lote	US112932	Medio a evaluar	Agar Plate Count Agar	
pH inicial	6,7	pH final	7,0	Cepas Interferentes	No Aplica	
Placa N°		Cepas deseadas	<i>Escherichia coli</i> (serotype O157:H7) ATCC 43888			
Productividad						
Cuadrante	Analista	Valor promedio de la estría	Valor del cuadrante	Valor de la estría central	Índice de crecimiento absoluto	Nivel de productividad
1	1	0,2	1,0	1	4,9	ALTO
	2	0,2	1,0			
2	1	0,2	1,0			
	2	0,2	1,0			
3	1	0,2	1,0			
	2	0,2	1,0			
4	1	0,2	1,0			
	2	0,2	1,0			

## Figura 5

*Resultados prueba productividad de E. Coli en medio Agar Plate Count*



Los resultados de la prueba indican un nivel alto de productividad para el crecimiento de la cepa con un Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) de 4,9.

Para el cálculo de la determinación del recuento de microorganismos Mesófilos aerobios expresado como UFC/g o mL, se basó en la siguiente expresión matemática teniendo en cuenta cajas con un conteo entre 30 a 300 colonias:

### Ecuación 1

*Recuento de colonias mesófilas UFC/g o mL*

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Donde:

$\sum a$  = Suma de colonias mesófilas en todas las cajas seleccionadas

V = Volumen del inculo de cada caja, mL

$n_1$  = Número de cajas seleccionadas de la primera dilución

$n_2$  = Número de cajas seleccionadas de la segunda dilución

d = Factor de dilución correspondiente a la primera dilución seleccionada (la suspensión inicial es una dilución)

Con la ecuación anterior se determinó el recuento de colonias mesófilas expresado como UFC/g o mL del grupo básico de muestras, en la que se incluye: blanco, estándares y muestras naturales, los resultados se consignaron en el formato GO-FT-115 “Planilla de ensayos microbiológicos de alimentos y bebidas”, organizados por día y por analista, teniendo en cuenta que cada muestra se procesó por duplicado. Una vez ha sido obtenido el recuento, se hace su equivalencia redondeando el resultado calculado a dos cifras significativas y se muestra en notación científica.

En este procedimiento de verificación del método de recuento en placa para la determinación de microorganismos Mesófilos aerobios en muestras de alimentos y bebidas, se aplicaron los siguientes parámetros: repetibilidad, repetibilidad intermedia, precisión y veracidad.

Para este método los datos de precisión se encuentran representados en términos de repetibilidad y reproducibilidad, en el primero la diferencia absoluta entre los resultados analíticos obtenidos empleando el mismo método sobre un material analítico idéntico, en el mismo laboratorio por el mismo analista y empleando el mismo equipo en un intervalo de tiempo corto no debería ser mayor que el límite de repetibilidad,  $r = 0.25$  en  $\log_{10}$  (NTC 4519:2009); y el segundo, la diferencia absoluta entre los resultados analíticos obtenidos empleando el mismo método sobre un material analítico idéntico, en diferentes laboratorios por analistas diferentes y empleando diferentes equipos no debería ser mayor que el límite de reproducibilidad,  $R = 0.45$  en  $\log_{10}$  (NTC 4519:2009), teniendo en cuenta que para este caso en las condiciones de reproducibilidad se tendrá en cuenta la misma locación, ya que el laboratorio solo cuenta con una sede.

Por otra parte, la veracidad representada en términos de porcentaje (%) de recuperación, se determinó mediante la comparación del valor obtenido en el análisis de los estándares con un el valor teórico de los estándares de referencia, en este caso la cepa *E. Coli* ATCC 43888, cuya concentración teórica es  $1,5 * 10^8 UFC/mL$ , la cual es obtenida utilizando tubo certificado en la escala de Mc Farland de 0,5; dicho porcentaje debe encontrarse en el rango entre 98 – 102% teniendo en cuenta el contenido del 100% de la muestra.

Los resultados de estos parámetros se encuentran consignados en tablas estadísticas, las cuales fueron analizadas y agrupadas en cuadros de acuerdo con los días en que se llevó a cabo el procedimiento, los estándares, matrices (muestras naturales) y por parámetros disponibles en los informes de validación entregados al laboratorio.

A continuación, se presenta en la tabla 17 un resumen de los resultados obtenidos del proceso de verificación de validación de este método:

**Tabla 17**

*Resultados verificación de validación del Método Horizontal para el Recuento de Microorganismos: Técnica de recuento de colonias a 30 °C en muestras de alimentos y bebidas*

RESUMEN DE RESULTADOS														
NOMBRE DEL MÉTODO			MESÓFILOS AEROBIOS											
Matriz	Analista	UFC/g	Log 10 UFC/g		Varianza	Límite de repetibilidad ( $r \leq 0,25$ )	Límite de reproducibilidad ( $R \leq 0,45$ )	Prueba F	Prueba T	Veracidad % Recuperación n = 98 - 102%	Comparación con la Norma regulatoria de referencia			
			Media	Desviación estándar							Norma de regulación	m	M	Cumple
Blanco	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	101,165	-	-	-	-
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000								
Estándar	1	1,50E+08	1,810	0,010	0,111	0,015	0,015	0,974	0,484		-	-	-	-
	2	1,53E+08	1,815	0,007	0,113	0,009								
M1	1	1,99E+07	2,012	0,010	0,026	0,014	0,029	0,727	0,369		-	-	-	-
	2	1,92E+07	1,991	0,011	0,031	0,016								
M2	1	2,69E+04	2,027	0,008	0,149	0,011	0,034	0,832	0,420		-	-	-	-
	2	2,60E+04	1,996	0,011	0,169	0,016								
M3	1	1,79E+06	1,983	0,009	0,009	0,012	0,009	0,966	0,407		NTC	-	100000	NO CUMPLE
	2	1,82E+06	1,991	0,007	0,009	0,009								
M4	1	1,71E+07	1,957	0,010	0,016	0,014	0,011	0,886	0,409		-	-	-	-
	2	1,75E+07	1,968	0,012	0,015	0,016								
M5	1	3,08E+04	2,100	0,008	0,134	0,011	0,017	0,944	0,460	-	-	-	-	
	2	3,15E+04	2,114	0,008	0,128	0,011								
M6	1	3,18E+05	2,217	0,006	0,025	0,008	0,006	0,992	0,467	Resolución	20000	50000	NO CUMPLE	
	2	3,15E+05	2,211	0,006	0,025	0,009				7992:1991				

Los resultados presentados fueron obtenidos a partir del análisis de 7 mediciones a cada una de las 6 muestras objeto (muestras naturales), incluyendo una muestra blanco y una muestra estándar para cada matriz por duplicado entre cada analista, el cual se llevó a cabo con dos analistas, obteniendo un total de 76 datos experimentales por cada grupo básico de muestra (blanco, estándar, matriz de muestra natural) y por cada analista, del cual se puede evidenciar obtuvo un considerable crecimiento de estos microorganismos aislados sobre un agar de enriquecimiento Plate Count (PCA) a una temperatura de 30 °C durante un máximo de 72 horas como se muestran en la figura 6:

### Figura 6

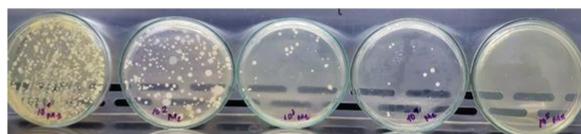
*Resultados del recuento del proceso de verificación de validación del método horizontal para microorganismos aerobios en muestras de alimentos y bebidas*



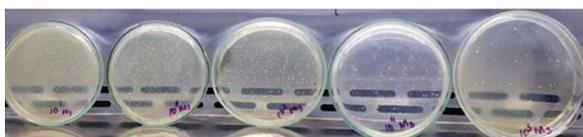
a) Recuento estándar cepa de referencia *E. Coli* ATCC 43888



b) Recuento muestra natural M1



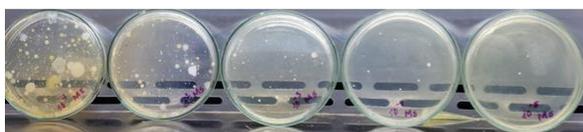
c) Recuento muestra natural M2



d) Recuento muestra natural M3



e) Recuento muestra natural M4



f) Recuento muestra natural M5



g) Recuento muestra natural M6

Los datos anteriormente expuestos (tabla 17), muestran un nivel de aceptación al presentar como resultado valores dentro de los límites establecidos por el método (límite de repetibilidad < 0,25 y límite de reproducibilidad < 0,45; y veracidad de 101%) y al comprobar

que no existen diferencias significativas de las mediciones entre los analistas. Adicionalmente, los resultados obtenidos en UFC/g o mL expresados en notación científica, se comparan con los índices máximos permisibles para identificar el nivel de buena y aceptable calidad (valores de m y M respectivamente) de acuerdo con los requerimientos microbiológicos estipulado por las normas regulatorias a la muestra natural, es decir producto alimentario, correspondiente, dando o no cumplimiento a lo exigido por dichas regulaciones, en este caso se puede observar el no cumplimiento de estas.

- ***Verificación de validación del método para la determinación de Staphylococcus aureus coagulasa positiva***

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en la Norma Técnica Colombiana NTC 4779:2007.

Las muestras fueron tomadas al azar cuya procedencia es anónima siguiendo las directrices planteadas por el laboratorio establecidas en el documento GO-IT-018 “Toma, manejo y recepción de muestras”, las cuales fueron ingresadas e identificadas de la siguiente manera:

- M1: Muestra natural de carne cruda (ALI-1401M-0821)
- M2: Muestra natural de pollo (ALI-1402M-0821)
- M3: Muestra natural de carne procesada cocida (ALI-1435M-0821)
- M4: Muestra natural de pescado fresco crudo (ALI-1605M-0921)
- M5: Muestra natural de mariscos (ALI-1606M-0921)

La porción de ensayo, suspensión y diluciones iniciales se realizaron teniendo en cuenta lo descrito en las normas NTC 4491-1:2005, NTC 4491-2:2004 y NTC 4491-3:2004; y en lo estipulado en los instructivos analíticos del laboratorio para la metodología (GO-IT-087). Se

realizaron diluciones seriadas en base 10 (obteniendo así las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  hasta  $10^{-7}$ ), esto con el fin de disminuir la carga microbiológica de la muestra para hacerla cuantificable.

Se estableció como cepa de referencia el microorganismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de tercer paso.

Como controles de calidad del medio se realizaron pruebas ecometrías para determinar la productividad con la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y selectividad con la cepa *E. Coli* ATCC 43888 empleando medio Agar Baird Parker; además, también se realiza control del agua destilada estéril utilizado en la preparación de todos los reactivos y medios de cultivo obteniendo los siguientes resultados como se muestran en la tabla 18 y en la figura 7, teniendo en cuenta lo propuesto por la guía GTC 171:2008 para la determinación de resultados y el nivel de productividad y selectividad de dicho medio:

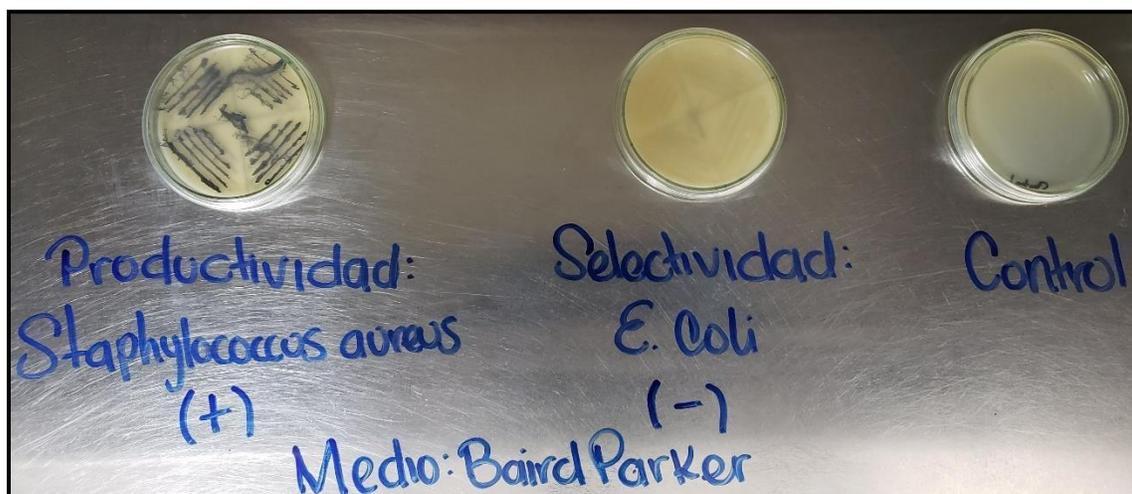
**Tabla 18**

*Resultados prueba Ecometría del medio de cultivo Agar Baird Parker para el del Método Horizontal para el Recuento de Staphylococcus aureus coagulasa positiva*

Fecha vencimiento		Julio de 2023	Lote		US111877B		Medio a evaluar		Agar Baird Parker			
Placa N°		pH inicial		7,1		Cepas deseadas		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923				
		pH final		7,2		Cepas Interferentes		<i>E. Coli</i> ATCC 43888				
		Productividad					Selectividad					
Cuadrante	Analista	Valor promedio de la estría	Valor del cuadrante	Valor de la estría central	Índice de crecimiento absoluto	Nivel de productividad	Valor promedio de la estría	Valor del cuadrante	Valor de la estría central	Índice de crecimiento absoluto	Nivel de selectividad	
1	1	0,2	1,0	1	4,9	ALTO	0,0	0,0	0,0	0,0	ALTO	
	2	0,2	1,0				0,0	0,0				
2	1	0,2	1,0				0,0	0,0				
	2	0,2	1,0				0,0	0,0				
3	1	0,2	1,0				0,0	0,0				
	2	0,2	1,0				0,0	0,0				
4	1	0,2	1,0				0,0	0,0				
	2	0,2	1,0				0,0	0,0				

**Figura 7**

Resultados prueba productividad y selectividad de *Staphylococcus aureus* en medio Agar Baird Parker



Los resultados de la prueba indican un nivel alto de productividad y selectividad para el crecimiento en el medio con un Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) de 4,9 y 0,0 respectivamente.

Para el cálculo de la determinación del recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva expresado como UFC/g o mL, se basó en las siguientes expresiones matemáticas teniendo que en primera instancia se realiza el cálculo de  $a$  (suma total de colonias tanto típicas como atípicas, ecuación 2) para calcular  $N$  (número de *Staphylococcus* presentes en la porción de muestra, ecuación 3) considerando cajas con un conteo entre 20 a 200 colonias, como se presenta a continuación:

**Ecuación 2**

Número de  $a$  de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva para caja seleccionada

$$a = \frac{b_c}{A_c} * C_c + \frac{b_{nc}}{A_{nc}} * C_{nc}$$

Donde:

$A_c$  = Número de colonias típicas sometidas a la prueba de la coagulasa

$A_{nc}$  = Número de colonias atípicas sometidas a la prueba de la coagulasa

$b_c$  = Número de colonias típicas positivas para la prueba de la coagulasa

$b_{nc}$  = Número de colonias atípicas positivas para la prueba de la coagulasa

$C_c$  = Número total de colonias típicas vistas en la caja

$C_{nc}$  = Número total de colonias atípicas vistas en la caja

### Ecuación 3

Número de  $N$  de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva presente en la porción de muestra

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Donde:

$\sum a$  = Suma de colonias de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva en todas las cajas seleccionadas

$V$  = Volumen del inóculo de cada caja, mL

$n_1$  = Número de cajas seleccionadas de la primera dilución

$n_2$  = Número de cajas seleccionadas de la segunda dilución

$d$  = Factor de dilución correspondiente a la primera dilución seleccionada (la suspensión inicial es una dilución)

Con las ecuaciones anteriores se determinó el recuento de colonias de *Staphylococcus aureus* expresado como UFC/g o mL del grupo básico de muestras, en la que se incluye: blanco, estándares y muestras naturales, los resultados se consignaron en el formato GO-FT-115 “Planilla de ensayos microbiológicos de alimentos y bebidas”, organizados por día y por analista, teniendo en cuenta que cada muestra se procesó por duplicado. Una vez ha sido obtenido el

recuento, se hace su equivalencia redondeando el resultado calculado a dos cifras significativas y se muestra en notación científica.

En este procedimiento de verificación del método de recuento en placa para la determinación de microorganismos *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos y bebidas, se aplicaron los siguientes parámetros: repetibilidad, repetibilidad intermedia, precisión y veracidad.

Para este método los datos de precisión se encuentran representados en términos de repetibilidad y reproducibilidad, en el primero la diferencia absoluta entre los resultados analíticos obtenidos empleando el mismo método sobre un material analítico idéntico, en el mismo laboratorio por el mismo analista y empleando el mismo equipo en un intervalo de tiempo corto no debería ser mayor que el límite de repetibilidad,  $r = 0.28$  en  $\log_{10}$  (NTC 4779:2007); y el segundo, la diferencia absoluta entre los resultados analíticos obtenidos empleando el mismo método sobre un material analítico idéntico, en diferentes laboratorios por analistas diferentes y empleando diferentes equipos no debería ser mayor que el límite de reproducibilidad,  $R = 0.43$  en  $\log_{10}$  (NTC 4779:2007), teniendo en cuenta que para este caso en las condiciones de reproducibilidad se tendrá en cuenta la misma locación, ya que el laboratorio solo cuenta con una sede.

Por otra parte, la veracidad representada en términos de porcentaje (%) de recuperación, se determinó mediante la comparación del valor obtenido en el análisis de los estándares con un el valor teórico de los estándares de referencia, en este caso la cepa *S. Aureus* ATCC 25923, cuya concentración teórica es  $1,5 * 10^8 UFC/mL$ , la cual es obtenida utilizando tubo certificado en la escala de Mc Farland de 0,5; dicho porcentaje debe encontrarse en el rango entre 98 – 102% teniendo en cuenta el contenido del 100% de la muestra.

Los resultados de estos parámetros se encuentran consignados en tablas estadísticas, las cuales fueron analizadas y agrupadas en cuadros de acuerdo con los días en que se llevó a cabo el procedimiento, los estándares, matrices (muestras naturales) y por parámetros disponibles en los informes de validación entregados al laboratorio.

A continuación, se presenta en la tabla 19 un resumen de los resultados obtenidos del proceso de verificación de validación de este método:

**Tabla 19**

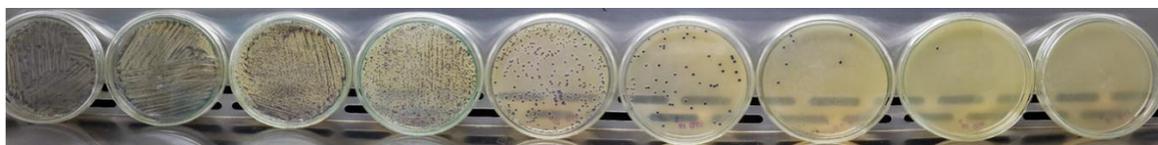
*Resultados verificación de validación del Método Horizontal para el Recuento de Staphylococcus aureus coagulasa positiva en muestras de alimentos y bebidas*

<b>RESUMEN DE RESULTADOS</b>														
<b>NOMBRE DEL MÉTODO</b>			<b>STAPHYLOCOCCUS AUREUS COAGULASA POSITIVA</b>											
<b>Matriz</b>	<b>Analista</b>	<b>UFC/g</b>	<b>Log 10 UFC/g</b>		<b>Varianza</b>	<b>Límite de repetibilidad (r ≤ 0,28)</b>	<b>Límite de reproducibilidad (R ≤ 0,43)</b>	<b>Prueba F</b>	<b>Prueba T</b>	<b>Veracidad % Recuperación = 98 - 102%</b>	<b>Comparación con la Norma regulatoria de referencia</b>			
			<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>							<b>Norma de regulación</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>Cumple</b>
Blanco	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	98,546	-	-	-	-
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000					-	-	-	-
Estándar	1	1,48E+08	1,791	0,014	0,125	0,019	0,011	0,972	0,496		-	-	-	-
	2	1,48E+08	1,789	0,010	0,128	0,014					-	-	-	-
M1	1	1,27E+06	1,717	0,028	0,133	0,040	0,028	0,963	0,493		NTC 1325:2008	100	300	NO CUMPLE
	2	1,29E+06	1,719	0,025	0,136	0,036					NTC 3644-2:1998	100	500	NO CUMPLE
M2	1	2,43E+06	2,086	0,014	0,038	0,020	0,015	0,993	0,455		NTC 1325:2008	1000	-	NO CUMPLE
	2	2,47E+06	2,094	0,013	0,038	0,019					Resolución 0122:2012	100	1000	NO CUMPLE
M3	1	1,07E+06	1,670	0,025	0,098	0,036	0,025	0,942	0,446		Resolución 0122:2012	100	1000	NO CUMPLE
	2	1,04E+06	1,654	0,027	0,102	0,039					Resolución 0122:2012	100	1000	NO CUMPLE
M4	1	1,26E+06	1,721	1,721	0,008	0,020	0,025	0,929	0,453	Resolución 0122:2012	100	1000	NO CUMPLE	
	2	1,23E+06	1,705	1,705	0,015	0,035				Resolución 0122:2012	100	1000	NO CUMPLE	
M5	1	1,93E+06	1,846	0,030	0,194	0,043	0,029	0,908	0,461	Resolución 0122:2012	100	1000	NO CUMPLE	
	2	1,91E+06	1,830	0,035	0,207	0,049				Resolución 0122:2012	100	1000	NO CUMPLE	

Los resultados presentados fueron obtenidos a partir del análisis de 7 mediciones a cada una de las 5 muestras objeto (muestras naturales), incluyendo una muestra blanco y una muestra estándar para cada matriz por duplicado entre cada analista, el cual se llevó a cabo con dos analistas, obteniendo un total de 68 datos experimentales por cada grupo básico de muestra (blanco, estándar, matriz de muestra natural) y por cada analista, del cual se puede evidenciar obtuvo un considerable crecimiento de estos microorganismos aislados sobre el medio Agar Baird Parker a una temperatura de 35 °C durante un máximo de 48 horas como se muestran en la figura 8 y positividad en la prueba de coagulasa en donde el coágulo ocupa desde un cuarto del volumen original del líquido como se presenta en la figura 9:

### Figura 8

*Resultados del recuento del proceso de verificación de validación del método horizontal para Staphylococcus aureus en muestras de alimentos y bebidas*



a) Recuento estándar cepa de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



b) Recuento muestra natural M1



c) Recuento muestra natural M2



d) Recuento muestra natural M3



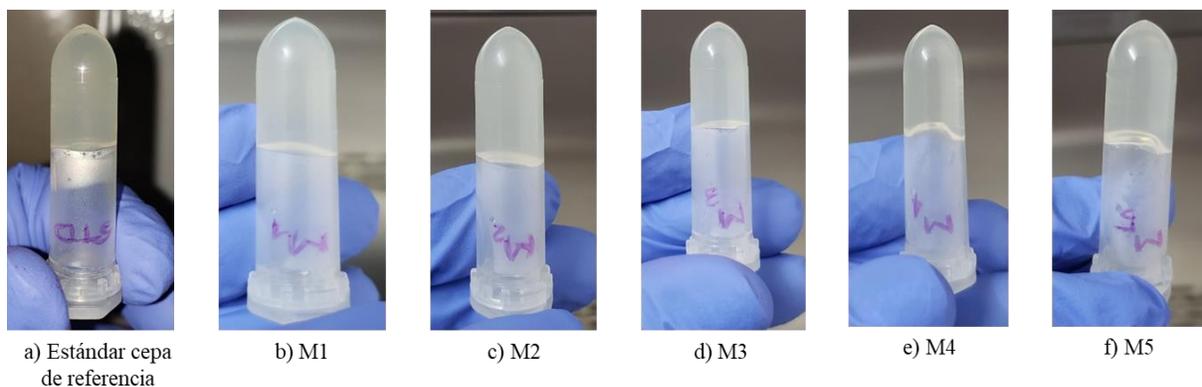
e) Recuento muestra natural M4



f) Recuento muestra natural M5

## Figura 9

*Resultados prueba de coagulasa para la confirmación de la presencia de Staphylococcus aureus en muestras de alimentos y bebidas*



Los datos anteriormente expuestos (tabla 19), muestran un nivel de aceptación al presentar como resultado valores dentro de los límites establecidos por el método (límite de repetibilidad  $< 0,28$  y límite de reproducibilidad  $< 0,43$ ; y veracidad de 98,5%) y al comprobar que no existen diferencias significativas de las mediciones entre los analistas. Adicionalmente, los resultados obtenidos en UFC/g o mL expresados en notación científica, se comparan con los índices máximos permisibles para identificar el nivel de buena y aceptable calidad (valores de m y M respectivamente) de acuerdo con los requerimientos microbiológicos estipulado por las normas regulatorias a la muestra natural, es decir producto alimentario, correspondiente, dando o no cumplimiento a lo exigido por dichas regulaciones, en este caso se puede observar el no cumplimiento de estas.

Resultados similares fueron encontrados por Padilla (2007), en donde se obtuvieron coeficientes de variación con altos grados de concordancia para diferentes ensayos en *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, logrando así, evaluar de manera satisfactoria la repetibilidad y reproducibilidad de las técnicas utilizadas.

Cuellar (2015) realizó la verificación del método para la enumeración y confirmación de *Staphylococcus aureus* en Petrifilm™, mientras que López y Uribe (2015), validaron el método de Número Más Probable (NPM) para *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva en muestras de leche cruda. Ambos autores a través de los procesos de validación demostraron que este microorganismo es de importancia en la gestión de los procedimientos de la inocuidad, ya que representa uno de los patógenos con mayor índice de generación de ETAs, principalmente debido a las inadecuadas prácticas de higiene en la manipulación de alimentos.

- ***Verificación de validación del método para la enumeración de Escherichia coli***

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en el Manual Analítico Bacteriológico BAM capítulo 4.

Las muestras fueron tomadas al azar cuya procedencia es anónima siguiendo las directrices planteadas por el laboratorio establecidas en el documento GO-IT-018 “Toma, manejo y recepción de muestras”, las cuales fueron ingresadas e identificadas de la siguiente manera:

- M1: Muestra natural de carne cruda (ALI-2211M-1221)
- M2: Muestra natural de pollo (ALI-2213M-1221)
- M3: Muestra natural de carne procesada cocida (ALI-2231M-1221)
- M4: Muestra natural de pescado fresco crudo (ALI-2267M-1221)
- M5: Muestra natural de mariscos (ALI-2281M-1221)

La porción de ensayo, suspensión y diluciones iniciales se realizaron teniendo en cuenta lo descrito en los manuales BAM capítulo 1 y 4; y en lo estipulado en los instructivos analíticos del laboratorio para la metodología (GO-IT-088). Se realizaron diluciones seriadas en base 10

(obteniendo así las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ), esto con el fin de disminuir la carga microbiológica de la muestra para hacerla cuantificable.

Se estableció como cepa de referencia el microorganismo *Escherichia coli* ATCC 43888 de tercer paso.

Como controles de calidad del medio se realizaron pruebas ecometrías para determinar la productividad con la cepa *E. Coli* ATCC 43888 y selectividad con la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 empleando medio Agar L-EMB (Levine Eosina Azul de Metileno); además, también se realiza control del agua destilada estéril utilizado en la preparación de todos los reactivos y medios de cultivo obteniendo los siguientes resultados como se muestran en la tabla 20 y en la figura 10, teniendo en cuenta lo propuesto por la guía GTC 171:2008 para la determinación de resultados y el nivel de productividad y selectividad de dicho medio:

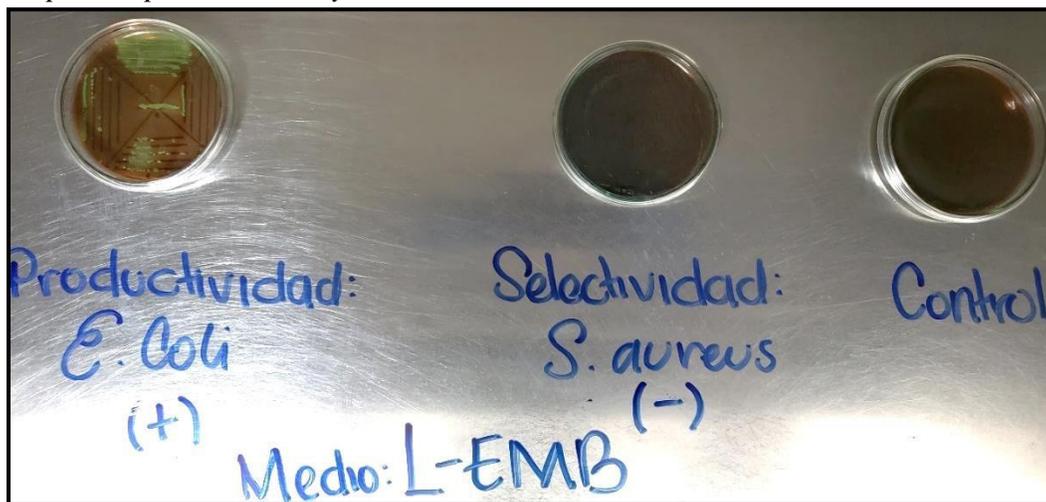
**Tabla 20**

*Resultados prueba ecometría del medio de cultivo Agar L-EMB para el método de Número Más Probable (NPM) para la enumeración de E. Coli*

Fecha vencimiento		Julio de 2023	Lote	US111877B		Medio a evaluar		Agar Baird Parker			
Placa N°		pH inicial		7,1		Cepas deseadas		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		pH final		7,2		Cepas Interferentes		<i>E. Coli</i> ATCC 43888			
		Productividad					Selectividad				
Cuadrante	Analista	Valor promedio de la estría	Valor del cuadrante	Valor de la estría central	Índice de crecimiento absoluto	Nivel de productividad	Valor promedio de la estría	Valor del cuadrante	Valor de la estría central	Índice de crecimiento absoluto	Nivel de selectividad
1	1	0,2	1,0	1	4,2	MEDIA	0,0	0,0	0,0	0,0	ALTO
	2	0,2	1,0				0,0	0,0			
2	1	0,08	0,4				0,0	0,0			
	2	0,08	0,4				0,0	0,0			
3	1	0,2	1,0				0,0	0,0			
	2	0,2	1,0				0,0	0,0			
4	1	0,16	0,8				0,0	0,0			
	2	0,16	0,8				0,0	0,0			

## Figura 10

Resultados prueba productividad y selectividad de *Escherichia coli* en medio L-EMB



Los resultados de la prueba indican un nivel medio de productividad y un nivel alto de selectividad para el crecimiento en el medio con un Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) de 4,2 y 0,0 respectivamente.

Para el cálculo de la enumeración de microorganismos de *Escherichia coli* expresado en NPM/g o mL, se basó teniendo en cuenta las consideraciones planteadas en la BAM capítulo 4 en el apéndice 2 de acuerdo con la tabla 1 para 3 tubos cada uno con inóculos de 0,1, 0,01 y 0,01 g, los MPN/g con intervalos de confianza del 95%; y la tabla 2 para 5 tubos cada uno con inóculos de 0,1, 0,01 y 0,001 g, los MPN/g con intervalos de confianza del 95%.

La tabla 1 para 3 se utiliza para la determinación de *E. Coli* en muestras de productos cárnicos, avícolas, bebidas y agua. Por otra parte, la tabla 2 correspondiente para 5 tubos es utilizada en la determinación del patógeno en muestras de productos de pesca utilizando inóculos de 10, 1, 0,1, 0,01 y 0,001 mL a partir de la suspensión inicial, que posteriormente teniendo en cuenta los resultados arrojados en cada tubo y a las consideraciones planteadas en la norma se escoge una combinación correspondiente a los inóculos planteados en la tabla para establecer el valor de NPM/g.

Finalmente, de acuerdo con el recuento obtenido en las pruebas confirmatorias se calcula en general el número de  $N$  presente en la porción de una muestra con la siguiente expresión matemática, teniendo en cuenta que NPM/g es homologo a UFC/g:

#### **Ecuación 4**

*Número de  $N$  de Escherichia coli presente en la porción de muestra*

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Donde:

$\sum a$  = Suma de colonias confirmadas de *E. Coli* en todas las cajas seleccionadas

$V$  = Volumen del inculo de cada caja, mL

$n_1$  = Número de cajas seleccionadas de la primera dilución

$n_2$  = Número de cajas seleccionadas de la segunda dilución

$d$  = Factor de dilución correspondiente a la primera dilución seleccionada (la suspensión inicial es una dilución)

Con lo anterior se determinó la cantidad de microorganismo *E. Coli* expresado como NPM/g o mL del grupo básico de muestras, en la que se incluye: blanco, estándares y muestras naturales, los resultados se consignaron en el formato GO-FT-115 “Planilla de ensayos microbiológicos de alimentos y bebidas”, organizados por día y por analista, teniendo en cuenta que cada muestra se procesó por duplicado. Una vez ha sido obtenido el recuento, se hace su equivalencia redondeando el resultado calculado a dos cifras significativas y se muestra en notación científica.

En este procedimiento de verificación del método de enumeración para la determinación de *Escherichia coli* en muestras de alimentos y bebidas, se aplicaron los siguientes parámetros: repetibilidad, repetibilidad intermedia, precisión y veracidad.

Para este método los datos de precisión se encuentran representados en términos de repetibilidad y reproducibilidad teniendo en cuenta para ambos parámetros un criterio de aceptación impuesto por el laboratorio de inferior o igual al 2% en términos de desviación estándar relativa, es decir  $RSD \leq 2\%$  en  $\log_{10}$ , esto es también de acuerdo a lo planteado y recomendado en las diferentes guías de validación de métodos analíticos como en la “Guía de validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición” del Instituto de Salud Pública de Chile (2017); además, teniendo en cuenta que para este caso en las condiciones de reproducibilidad se tendrá en cuenta la misma locación, ya que el laboratorio solo cuenta con una sede.

Por otra parte, la veracidad representada en términos de porcentaje (%) de recuperación, se determinó mediante la comparación del valor obtenido en el análisis de los estándares con un el valor teórico de los estándares de referencia, en este caso la cepa *E. Coli* ATCC 43888, cuya concentración teórica es  $1,5 * 10^8 UFC/mL$ , la cual es obtenida utilizando tubo certificado en la escala de Mc Farland de 0,5; dicho porcentaje debe encontrarse en el rango entre 98 – 102% teniendo en cuenta el contenido del 100% de la muestra.

Los resultados de estos parámetros se encuentran consignados en tablas estadísticas, las cuales fueron analizadas y agrupadas en cuadros de acuerdo con los días en que se llevó a cabo el procedimiento, los estándares, matrices (muestras naturales) y por parámetros disponibles en los informes de validación entregados al laboratorio.

A continuación, se presenta en la tabla 21 un resumen de los resultados obtenidos del proceso de verificación de validación de este método:

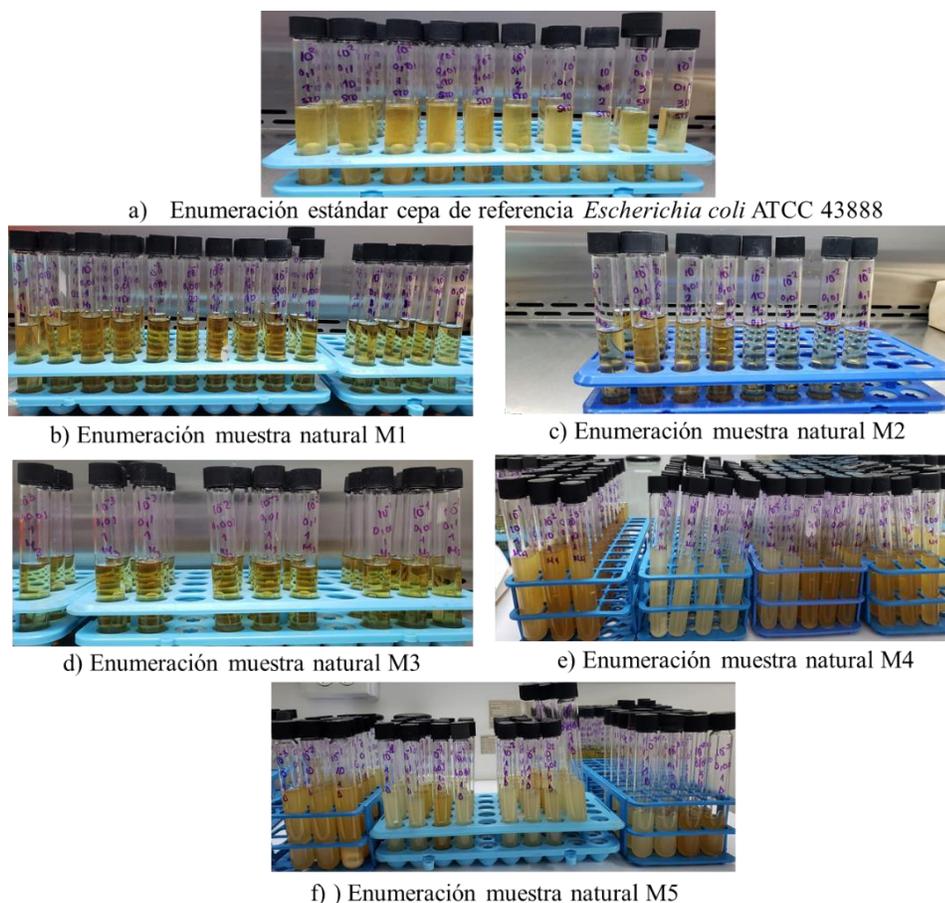
**Tabla 21**

*Resultados verificación de validación para la enumeración de Escherichia coli, método de tubos de fermentación (NPM) en muestras de alimentos y bebidas*

RESUMEN DE RESULTADOS														
NOMBRE DEL MÉTODO			ESCHERICHIA COLI											
Matriz	Analista	NPM/g	Log 10 UFC/g		Varianza	Repetibilidad (RSD <2%)	Reproducibilidad (RSD Combinada <2%)	Prueba F	Prueba T	Veracidad % Recuperación = 98 - 102%	Comparación con la Norma regulatoria de referencia			
			Media	Desviación estándar							Norma de regulación	m	M	Cumple
Blanco	1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	101,745	-	-	-	-
	2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000					-	-	-	-
Estándar	1	1,52,E+08	1,261	0,004	0,517	0,003	0,006	0,967	0,484		-	-	-	-
	2	1,53,E+08	1,250	0,009	0,529	0,007					-	-	-	
M1	1	1,09,E+04	1,842	0,013	1,137	0,007	0,007	0,991	0,500		NTC 1325:2008	100	400	NO CUMPLE
	2	1,09,E+04	1,842	0,012	1,131	0,007					-	-	-	
M2	1	2,52,E+03	1,608	0,014	0,382	0,009	0,009	0,986	0,489		-	-	-	-
	2	2,48,E+03	1,603	0,015	0,379	0,009					-	-	-	
M3	1	2,18,E+02	0,759	0,010	0,171	0,013	0,012	0,681	0,412		NTC 1325:2008	10	-	NO CUMPLE
	2	2,22,E+02	0,786	0,009	0,142	0,011					-	-	-	
M4	1	7,32,E+03	2,243	0,011	0,208	0,005	0,005	0,998	0,496	Resolución 0122:2012	10	400	NO CUMPLE	
	2	7,34,E+03	2,244	0,011	0,209	0,005				-	-	-		
M5	1	4,89,E+03	1,963	0,018	0,363	0,009	0,009	0,977	0,482	Resolución 0122:2012	10	100	NO CUMPLE	
	2	4,76,E+03	1,954	0,019	0,358	0,009				-	-	-		

## Figura 11

*Resultados del recuento del proceso de verificación de validación para la enumeración de Escherichia coli en muestras de alimentos y bebidas*

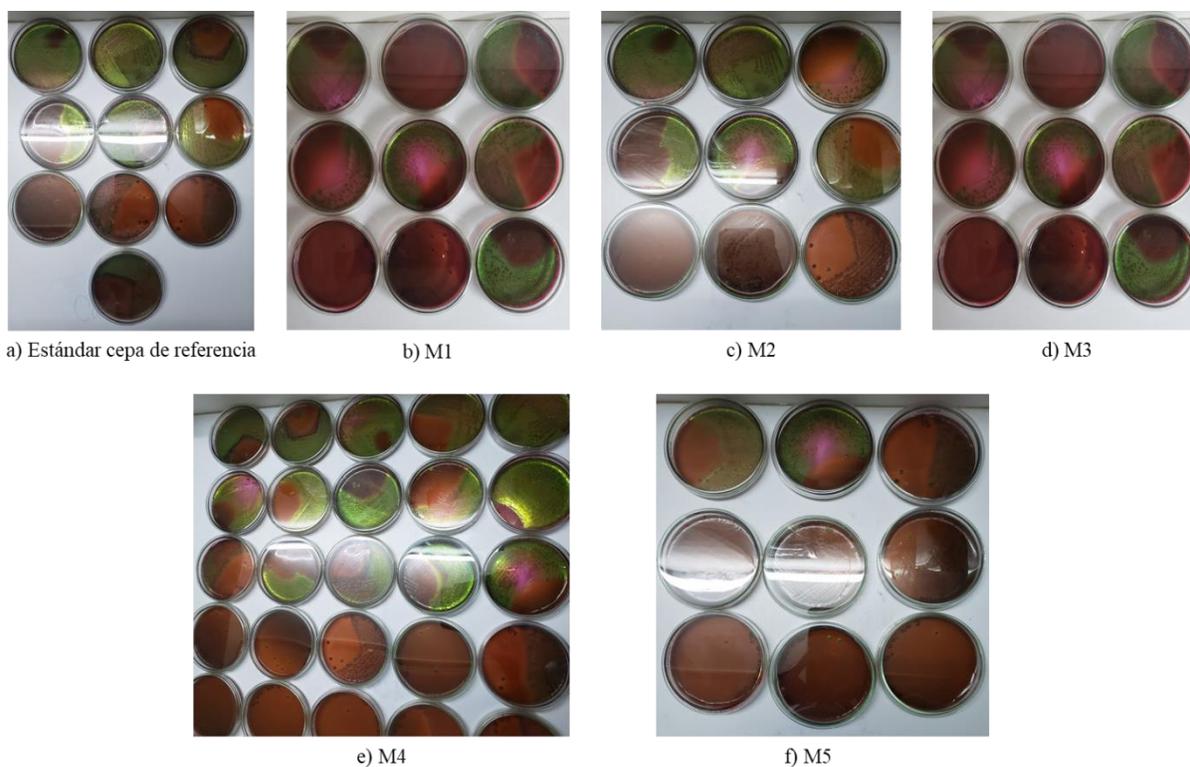


Los resultados presentados fueron obtenidos a partir del análisis de 7 mediciones a cada una de las 5 muestras objeto (muestras naturales), incluyendo una muestra blanco y una muestra estándar para cada matriz por duplicado entre cada analista, el cual se llevó a cabo con dos analistas, del cual se puede evidenciar la un considerable crecimiento de estos microorganismos aislado a través de la fermentación y producción de gas en caldo Lauryl y EC a una temperatura de temperatura de 35 °C y 44.5 °C respectivamente para cada etapa en el proceso de siembra en un tiempo de 24 a 48 horas como se muestra en la figura 11, además, de la positividad en la

prueba confirmatoria en medio de Agar L-EMB a una temperatura de 35 °C durante un máximo de 18 presentando colonias de color verde metálico como se expone en la figura 12:

### Figura 12

*Resultados prueba confirmatoria de la presencia de Escherichia coli en muestras de alimentos y bebidas*



Los datos anteriormente expuestos (tabla 21), muestran un nivel de aceptación al presentar como resultado valores dentro de los límites establecidos por el método ( $RSD \leq 2\%$ ; y veracidad de 101,745%) y al comprobar que no existen diferencias significativas de las mediciones entre los analistas. Adicionalmente, los resultados obtenidos en NPM/g o mL expresados en notación científica, se comparan con los índices máximos permisibles para identificar el nivel de buena y aceptable calidad (valores de m y M respectivamente) de acuerdo con los requerimientos microbiológicos estipulado por las normas regulatorias a la muestra

natural, es decir producto alimentario, correspondiente, dando o no cumplimiento a lo exigido por dichas regulaciones, en este caso se puede observar el no cumplimiento de estas.

López (2013), realizó la validación y el cálculo de incertidumbre de métodos microbiológicos tradicionales y el método NPM automatizado en la determinación de diferentes microorganismos en matrices cárnicas. Encontrando niveles satisfactorios en los parámetros de precisión y exactitud, cumpliendo así, con los criterios establecidos por las normas reguladoras. Teniendo en cuenta lo anterior, se puede afirmar que para la determinación de *Escherichia coli* es posible aplicar cualquier metodología, mientras éstas cumplan con los requerimientos normativos y sean acordes a lo exigido por la técnica en términos de materiales, equipos, entre otros, haciendo que los laboratorios, en particular, no sean limitados por estrictos procedimientos analíticos.

- ***Verificación de validación del método horizontal para la detección de Salmonella spp***

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en la Norma Técnica Colombiana NTC 4574:2007.

Las muestras fueron tomadas al azar cuya procedencia es anónima siguiendo las directrices planteadas por el laboratorio establecidas en el documento GO-IT-018 “Toma, manejo y recepción de muestras”, las cuales fueron ingresadas e identificadas de la siguiente manera:

- M1: Muestra natural de carne cruda (ALI-2156M-1121)
- M2: Muestra natural de pollo (ALI-2158M-1121)
- M3: Muestra natural de carne procesada cocida (ALI-2177M-1121)
- M4: Muestra natural de pescado fresco crudo (ALI-2178M-1121)

- M5: Muestra natural de mariscos (ALI-2193M-1121)

La porción de ensayo, suspensión y diluciones iniciales se realizaron teniendo en cuenta lo descrito en las normas NTC 4491-1:2005, NTC 4491-2:2004 y NTC 4491-3:2004; y en lo estipulado en los instructivos analíticos del laboratorio para la metodología (GO-IT-089), el cual pasa directamente a un proceso de enriquecimiento no selectivo a una temperatura de 37 °C durante un tiempo de 18 horas.

Se estableció como cepa de referencia el microorganismo *Salmonella entérica* ATCC 14028 de tercer paso.

Como controles de calidad del medio se realizaron pruebas ecometrías para determinar la productividad con la cepa *Salmonella entérica* ATCC 14028 y selectividad con la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 empleando los medios Agar XLD (Xilosa-Lisina-Desoxicolato) y Bismuto Sulfito; además, también se realiza control del agua destilada estéril utilizado en la preparación de todos los reactivos y medios de cultivo obteniendo los siguientes resultados como se muestran en la tabla 22 y 23; y en la figura 13, teniendo en cuenta lo propuesto por la guía GTC 171:2008 para la determinación de resultados y el nivel de productividad y selectividad de dichos medios:

Tabla 22

Resultados prueba ecometría del medio de cultivo Agar XLD para el del método horizontal para la detección de *Salmonella spp*

Fecha vencimiento		Agosto 2025	Lote		VM942387	Medio a evaluar		Agar XLD			
Placa N°		pH inicial		7,0		Cepas deseadas		<i>Salmonella entérica</i> ATCC 14028			
		pH final		7,3		Cepas Interferentes		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		Productividad					Selectividad				
Cuadrante	Analista	Valor promedio de la estría	Valor del cuadrante	Valor de la estría central	Índice de crecimiento absoluto	Nivel de productividad	Valor promedio de la estría	Valor del cuadrante	Valor de la estría central	Índice de crecimiento absoluto	Nivel de selectividad
1	1	0,2	1,0	1	4,9	ALTO	0,0	0,0	0,0	0,0	ALTO
	2	0,2	1,0				0,0	0,0			
2	1	0,2	1,0				0,0	0,0			
	2	0,2	1,0				0,0	0,0			
3	1	0,2	1,0				0,0	0,0			
	2	0,2	1,0				0,0	0,0			
4	1	0,2	1,0				0,0	0,0			
	2	0,2	1,0				0,0	0,0			

**Tabla 23**

*Resultados prueba ecometría del medio de cultivo Agar Bismuto Sulfito para el del método horizontal para la detección de Salmonella spp*

Fecha vencimiento		Agosto 2022	Lote	108809	Medio a evaluar			Agar Bismuto Sulfito				
Placa N°		pH inicial		7,2		Cepas deseadas		<i>Salmonella entérica</i> ATCC 14028				
		pH final		7,5		Cepas Interferentes		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923				
		Productividad					Selectividad					
Cuadrante	Analista	Valor promedio de la estría	Valor del cuadrante	Valor de la estría central	Índice de crecimiento absoluto	Nivel de productividad	Valor promedio de la estría	Valor del cuadrante	Valor de la estría central	Índice de crecimiento absoluto	Nivel de selectividad	
1	1	0,2	1,0	1	4,9	ALTO	0,0	0,0	0,0	0,0	ALTO	
	2	0,2	1,0				0,0	0,0				
2	1	0,2	1,0				0,0	0,0				
	2	0,2	1,0				0,0	0,0				
3	1	0,2	1,0				0,0	0,0				
	2	0,2	1,0				0,0	0,0				
4	1	0,2	1,0				0,0	0,0				
	2	0,2	1,0				0,0	0,0				

**Figura 13**

*Resultados prueba productividad y selectividad de Salmonella en los medios Agar XLD y Bismuto Sulfito*



Los resultados de la prueba indican un nivel alto de productividad y selectividad para el crecimiento en ambos medios con un Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) de 4,9 y 0,0 respectivamente.

En cuanto a la expresión de los resultados, estos se basan en la interpretación del análisis realizado indicando la presencia o ausencia de *Salmonella* en una porción de “X” gramos de producto, los cuales se realizaron en grupo básico de muestras en la que se incluye: blanco, estándares y muestras naturales, los resultados se consignaron en el formato GO-FT-115 “Planilla de ensayos microbiológicos de alimentos y bebidas”, organizados por día y por analista, teniendo en cuenta que cada muestra se procesó por duplicado.

En este procedimiento de verificación del método de detección en placa para la determinación del microorganismo *Salmonella* spp en muestras de alimentos y bebidas, se aplicaron los siguientes parámetros: sensibilidad, especificidad y eficiencia, los cuales se fueron calculados a partir de las siguientes expresiones matemáticas basados en lo descrito en la “Guía

de validación de métodos cualitativos para el análisis microbiológico” del Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS, 2015):

- ***Sensibilidad:***

#### **Ecuación 5**

*Porcentaje de sensibilidad*

$$\% \text{ Sensibilidad} = \frac{VP}{N_+} * 100$$

Donde:

$VP$  = Número total de muestras caracterizadas como verdaderas positivas

$N_+$  = Número de resultados caracterizados presuntivamente como positivos ( $VP + FN$ )

- ***Especificidad:***

#### **Ecuación 6**

*Porcentaje de especificidad*

$$\% \text{ Especificidad} = \frac{VN}{N_-} * 100$$

Donde:

$VN$  = Número total de muestras caracterizadas como verdaderas negativas

$N_-$  = Número de resultados caracterizados presuntivamente como negativos ( $VN + FP$ )

- ***Eficiencia:***

#### **Ecuación 7**

*Porcentaje de eficiencia*

$$\% \text{ Eficiencia} = \frac{VP + VN}{N} * 100$$

Donde:

$VP$  = Número total de muestras caracterizadas como verdaderas positivas

$VN$  = Número total de muestras caracterizadas como verdaderas negativas

$N$  = Número total de muestras ( $VP + VN + FP + FN$ )

Para los cálculos anteriores, se hizo necesario realizar la conversión de resultados cualitativos (presencia/ausencia) a datos cuantitativos, el cual se relaciona las proporciones relativas de muestras que se supone son positivos o negativos sobre la base de los resultados presuntivos con respecto a los resultados confirmados, es decir, el número de muestras resultantes positivas o negativas, teniendo en cuenta como criterio de aceptación valores superiores al 90% para cada parámetro.

Los resultados de estos parámetros se encuentran consignados en tablas estadísticas, las cuales fueron analizadas y agrupadas en cuadros de acuerdo con los días en que se llevó a cabo el procedimiento, los estándares, matrices (muestras naturales) y por parámetros disponibles en los informes de validación entregados al laboratorio.

A continuación, se presenta en la tabla 24 un resumen de los resultados obtenidos del proceso de verificación de validación de este método:

**Tabla 24**

*Resultados verificación de validación del método horizontal para la detección de Salmonella spp. en muestras de alimentos y bebidas*

RESUMEN DE RESULTADOS										
NOMBRE DEL MÉTODO				SALMONELLA SPP						
Matriz	Analista	Número total de muestras	Resultados Total	% Sensibilidad	% Especificidad	% Eficiencia	Comparación con la norma regulatoria de referencia			
			Presencia/Ausencia				Norma de regulación	m	M	Cumple
Blanco	1	14	Ausencia	-	100,0	101,0	-	-	-	-
	2	14	Ausencia							
Estándar	1	14	Presencia	100,0	-	100,0	-	-	-	-
	2	14	Presencia							
M1	1	14	Presencia	96,4	-	92,9	NTC 1325:2008	Ausencia	-	NO CUMPLE
	2	14	Presencia							
M2	1	14	Presencia	100,0	-	100,0	NTC 3644-2:1998	Ausencia	-	NO CUMPLE
	2	14	Presencia							
M3	1	14	Presencia	96,4	-	92,9	NTC 1325:2008	Ausencia	-	NO CUMPLE
	2	14	Presencia							
M4	1	14	Presencia	100,0	-	96,4	Resolución 0122:2012	Negativo	-	NO CUMPLE
	2	14	Presencia							
M5	1	14	Presencia	96,4	-	92,9	Resolución 0122:2012	Negativo	-	NO CUMPLE
	2	14	Presencia							

## Figura 14

Resultados del proceso de verificación de validación del método horizontal para la detección de *Salmonella* spp en muestras de alimentos y bebidas



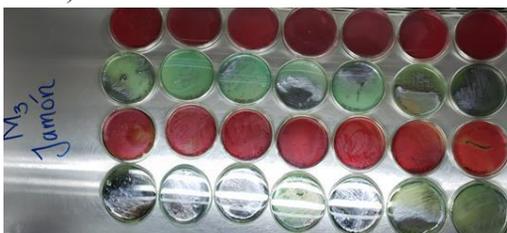
a) Detección estándar cepa de referencia *Salmonella* entérica ATCC 14028



b) Detección muestra natural M1



c) Detección muestra natural M2



d) Detección muestra natural M3



e) Detección muestra natural M4



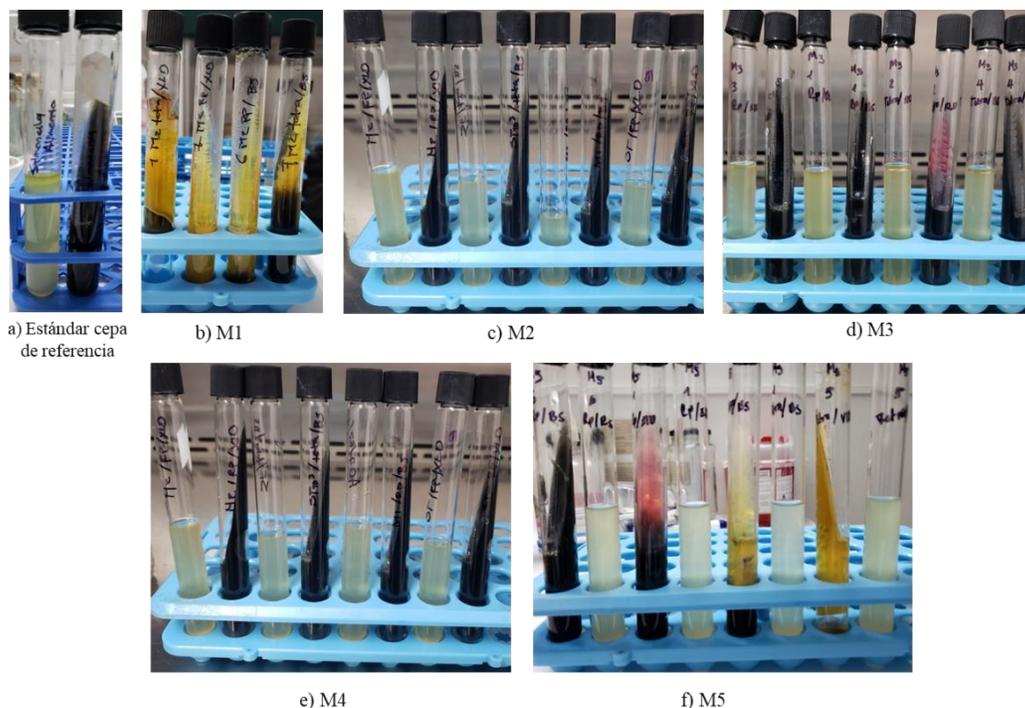
f) Detección muestra natural M5

Los resultados presentados fueron obtenidos a partir del análisis de 7 mediciones a cada una de las 5 muestras objeto (muestras naturales), incluyendo una muestra blanco y una muestra estándar para cada matriz por duplicado entre cada analista, el cual se llevó a cabo con dos analistas, del cual se puede evidenciar que se obtuvo un considerable crecimiento de estos microorganismos aislados sobre los medios Agar XLD y Bismuto Sulfito incubados a una

temperatura de 35 °C por 24 horas como se muestran en la figura 14 y la confirmación mediante pruebas bioquímicas como se presenta en la figura 15:

### Figura 15

*Resultados prueba confirmatoria de la presencia de Salmonella en muestras de alimentos y bebidas*



Los datos anteriormente expuestos (tabla 24), muestran un nivel de aceptación al presentar como resultado valores dentro de los límites establecidos por el método (valores mayores al 90% en sensibilidad, especificidad y eficiencia) y al comprobar que no existen diferencias significativas de las mediciones entre los analistas. Adicionalmente, los resultados obtenidos expresados como presencia/ausencia, se comparan con los índices máximos permisibles para identificar el nivel de buena y aceptable calidad (valores de  $m$  y  $M$  respectivamente) de acuerdo con los requerimientos microbiológicos estipulado por las normas regulatorias a la muestra natural, es decir producto alimentario, correspondiente, dando o no

cumplimiento a lo exigido por dichas regulaciones, en este caso se puede observar el no cumplimiento de estas.

Velasco et al (2017), establecieron los protocolos de validación de detección de *Salmonella* spp. en muestras de alimento para consumo animal. Se encontró que en dicho trabajo establecen un protocolo de validación muy similar al empleado en este proyecto, siguiendo lo expuesto en la norma NTC y aunque no realizan la validación de la misma manera, es un trabajo que sirve como base para llevar a cabo el procedimiento, tanto en la realización de la detección del microorganismo como en el análisis estadístico de los resultados, comprobando la viabilidad de estandarización de esta metodología.

Diversos estudios han demostrado que la *Salmonella* spp., afecta en gran medida las empresas del sector agroalimentario, destacándose en productos como huevos y sus derivados; productos lácteos; agua; carne y sus derivados y aves de corral. Para su detección, además de los métodos tradicionales (Sánchez, 2011; Riquelme, 2015), se han utilizado tecnologías avanzadas como métodos inmunoenzimáticos (Robledo, 2015) y herramientas moleculares (González et al., 2014).

Teniendo en cuenta lo anterior y analizando los resultados obtenidos en esta investigación, es posible afirmar que los procesos de validación de los métodos permiten evidenciar la importancia de este microorganismo en la gestión de la inocuidad en la industria de los alimentos, por tratarse de uno de los patógenos con mayor índice de generación de ETAs a nivel mundial y con capacidad de provocar graves consecuencias económicas, sociales y sanitarias.

## Conclusiones

A partir del análisis de los resultados obtenidos en este proyecto de Maestría es posible concluir que:

Se identificaron las matrices alimenticias teniendo en cuenta su demanda comercial y susceptibilidad a la contaminación por microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos – ETAs. Dichos alimentos fueron, carne bovina cruda, jamón, pechuga de pollo, pescado fresco crudo, mariscos precocidos y jugo de naranja. Los microorganismos para los análisis se seleccionaron por clasificarse como los principales indicadores de contaminación en alimentos o por su patogenicidad, fueron: mesófilos aerobios, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, *Escherichia Coli* y *Salmonella* spp.

De acuerdo con lo establecido en la GTC 125:2005, se implementaron los procedimientos para el análisis microbiológico en los alimentos y bebidas seleccionados. Dichos métodos analíticos se adaptaron teniendo en cuenta los recursos de la empresa, como estructura, personal, equipos, etc.

Se realizó la verificación de validación de cada uno de los métodos propuestos presentando resultados dentro de los límites establecidos por cada uno de ellos, consiguiendo niveles altos de precisión y veracidad en los análisis, lo que a su vez se traduce en la confiabilidad de los resultados.

Con el análisis comparativo de los índices máximos permisibles, se identificó que algunas muestras alimenticias analizadas no cumplieron con los estándares de buena y/o aceptable calidad, establecidos en las diferentes normas reguladoras. Para mesófilos aerobios, las muestras de jamón y jugo de naranja no cumplieron con la normatividad. Para *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp., todos los alimentos analizados incumplieron con los estándares de

aceptabilidad. Para *Escherichia coli*, únicamente la muestra de pechuga de pollo estuvo entre los niveles de cumplimiento. Esta situación, además de provocar un alto riesgo a la salud del consumidor, puede generar elevadas sanciones económicas, cierres temporales y/o permanentes de los establecimientos expendedores.

### **Recomendaciones**

Evaluar la incertidumbre analítica de cada uno de los métodos teniendo en cuenta todos los materiales y equipos involucrados en el proceso con sus respectivas especificaciones.

También es recomendable realizar un análisis de factibilidad comercial en el que se pueda determinar la rentabilidad que se puede obtener al ofrecer el servicio de análisis de calidad de alimentos presentando las opciones más convenientes para ellos y de cómo se puede repercutir a nivel social y hasta ambiental.

### Referencias bibliográficas

- Anonimo. (2013). Enfoque de la investigación (Sampieri).  
<https://prezi.com/8cvac4g50tyj/enfoque-de-la-investigacion-sampieri/>
- Caliba. (2014). La importancia de trabajar con un laboratorio Acreditado bajo Norma IRAM 301:05 –ISO/IEC 17025:05. [http://caliba.org.ar/inicio/Nota\\_Tecnica\\_May\\_2014.pdf](http://caliba.org.ar/inicio/Nota_Tecnica_May_2014.pdf)
- Camaro, M., Martinez, R., Olmos, P., Catal, V., Ocete, M., Gimeno, C. (2015). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología clínica*,, 31-36.
- Cardona, A. (Julio de 2013). Diseño Cuasi experimentales.  
[http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/renacip/disenos\\_cuasiexperimentales.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/renacip/disenos_cuasiexperimentales.pdf)
- Carrillo, E., Lozano, A. (2008). Validación del método de detección de coliformestotales y fecales en agua potable utilizando agar chromocult. PontificiaUniversidad Javeriana.
- Castillero, O. (2017). Los 15 tipos de investigación y características. Psicología y mente.  
Disponible: <https://psicologiaymente.com/miscelanea/tipos-de-investigacion>
- Comisión del Codex Alimentarius. (2002). *Informe de la 24ª reunión del comité del codex sobre métodos de análisis y toma de muestras*. Budapest: Codex.
- Cuellar, D. (Noviembre de 2015). Verificación del método para la enumeración y confirmación de *Staphylococcus aureus* en Petrifilm™, en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano. Zamorano, Honduras: Escuela Agrícola Panamericana.  
<https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/200328aa-a093-4625-a402-af79c92784e0/content>

- FAO. (1992). Manuales para el control de los alimentos: la garantía de la calidad en el laboratorio microbiológico de los alimentos. Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: <https://www.fao.org/3/t0451s/t0451s.pdf>
- Feng, P., Weagant, S., Grant, M., & Burkhardt, W. (10 de Septiembre de 2020). BAM Capítulo 4: Enumeración de *Escherichia coli* y las bacterias coliformes. Manual de análisis bacteriológico (BAM). <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>
- Gimferrer, N. (4 de Febrero de 2013). *Las siete bacterias más comunes en alimentos*. Consumer: <https://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/las-siete-bacterias-mas-comunes-en-alimentos.html>
- Gonzalez, J., Pereira, N., Soto, Z., Hernandez, E., Villarreal, J. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte*, 73-94.
- ICMSF. (1984). *Microorganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico*. Zaragoza: International Commission on Microbiological Specifications for Foods.
- ICONTEC. (2007). NTC 4574:Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. Bogota: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.
- ICONTEC. (2007). NTC 4779:Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de *Estafilococos* coagulasa positiva. Bogota: Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación.



- Meylin, L., Gonzalez, O., Cludio, D., Martinez, R. (2010). Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. *Métodos cualitativos*, 162-176.
- Ministerio de Salud Publica Cuba. (30 de Mayo de 2014). *Centro para el control estatal de medicamentos, equipos y dispositivos médicos*.  
<https://www.cecmecmed.cu/file/155/download?token=YFQB6yfH>
- NTC-ISO 17025. (2017). *NTC-ISO 17025 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. Bogota: Incontec.
- OMS. (2015). Enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) en la Región de America. *Carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria: estimacion de la OMS*.
- Organismo Nacional de Acreditación de Colombia. (05 de Mayo de 2021). *Presentación*.  
Disponible: <https://onac.org.co/presentacion#perfil-institucional>
- Padilla, J. (2007). Validación secundaria del metodo de recuento en placa en superficie de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos en un laboratorio de referencia. Bogota, Colombia: Pontifica Universidad Javeriana.  
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8666/tesis15.pdf?isAllowed=y&sequence=1>
- Riquelme, V. (2015). Verificación de un método alternativo para la detección de *Salmonella* spp. en matrices de alimentos. Santiago, Chile: Universidad de Chile.  
<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/134833/Verificaci%C3%B3n-de-un-m%C3%A9todo-alternativo-para-la-detecci%C3%B3n-de-Salmonella-spp-en-matrices-de-alimentos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Robledo, A. (24 de Abril de 2015). Investigación de *Salmonella* spp en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos. Barcelona, España:

Universidad Politecnica de Catalunya.

<https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/26111/memoria.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Sanchez, S. (Diciembre de 2011). Validación de un método de detección de Salmonella en huevos y pollo. España: Universidade Da Coruña.

[https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/9967/SanchezCanedo\\_Sonia\\_TFM\\_2012.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/9967/SanchezCanedo_Sonia_TFM_2012.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

Sanchez, J. D. (2015, mayo 4). OPS/OMS. Pan American Health Organization / World Health Organization.

[https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es)

Velasco, E., Prada, T., Fonseca, A. (2017). Protocolo de validación para el método horizontal de detección de Salmonella spp en muestras de alimento para consumo animal de un laboratorio de microbiología de una empresa avícola de Bucaramanga en el año 2017. Bucaramanga, Santander, Colombia: Universidad de Santander UDES.

<https://repositorio.udes.edu.co/bitstream/001/695/1/Protocolo%20de%20validaci%C3%B3n%20para%20el%20m%C3%A9todo%20horizontal%20de%20detecci%C3%B3n%20de%20salmonella%20spp%20en%20muestras%20de%20alimento%20para%20consumo%20animal%20de%20un%20laboratorio%20d>