



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

“Análisis Microbiológico en Quesos Frescos que se Expenden en
Supermercados de la Ciudad de Guayaquil, Determinando la
Presencia o Ausencia de *Listeria* y *Salmonella*”

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO DE ALIMENTOS

Presentada por:

Luis Antonio Plaza Ibarra

GUAYAQUIL-ECUADOR

Año: 2013

AGRADECIMIENTO

A la gran Familia que Dios me dio, a mis padres, a la familia que pude formar a lo largo de la carrera. Siendo todos, parte de este logro a mi directora de tesis M.Sc. María Fernanda Morales R. por brindarme su guía académica al Ing. Carlos Juárez por su ayuda y la Ing. Paola Aguayo pilares de este trabajo.

Luis Plaza Ibarra

DEDICATORIA

MIS PADRES

MIS AMIGOS

Luis Plaza Ibarra

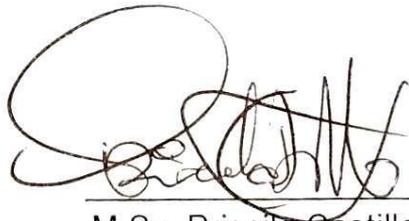
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Dr. Kleber Barcia V., Ph.D
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE



M.Sc. María Fernanda Morales R.
DIRECTORA

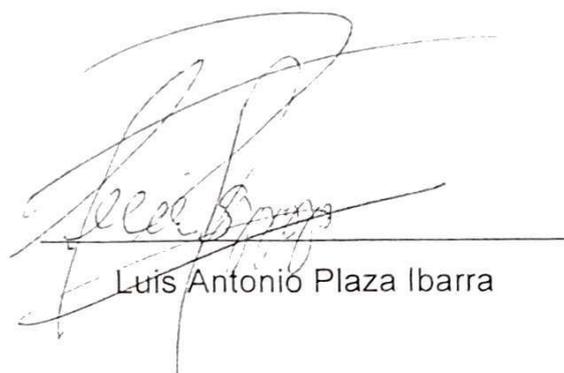


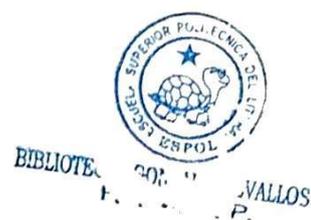
M.Sc. Priscila Castillo S.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL".

(Reglamento de Graduación de la Espol)


Luis Antonio Plaza Ibarra



RESUMEN

Las toxiinfecciones alimentarias provocadas por las especies de los géneros *Listeria* y *Salmonella*, son de gran importancia en los países desarrollados por el gran número de personas infectadas. La presencia de estos microorganismos en un alimento del alto consumo como el queso, representa un alerta en cuanto a los sistemas de gestión de inocuidad llevados a cabo en tales alimentos.

Pese a que la gama de los alimentos de alto riesgo de incidencia de algunas Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA) es muy extensa, los quesos acaparan el 15,1% de las intoxicaciones a nivel mundial. Los productos lácteos de alta demanda, como los quesos, se han encontrado recientemente involucrados en casos de intoxicación e infecciones alimentarias causadas, en su gran mayoría, por agentes microbianos como *Salmonella* y *Listeria*, debido a su amplia distribución en la naturaleza, su resistencia a variaciones de pH, salinidad y temperatura. A pesar de la alta demanda para este producto en la ciudad de Guayaquil, no se disponen de registros con incidencias de intoxicación por quesos frescos.

La problemática consiste en que no existen registros de estudios realizados, en el Ecuador sobre ETA's causadas por *Listeria* y *Salmonella* en quesos frescos. Por este motivo, se planteó demostrar la inocuidad de los quesos

frescos en las perchas de supermercados con mayor volumen de venta en la ciudad de Guayaquil.

Para determinar la presencia y/o ausencia de *Salmonella* y *Listeria*, como agentes contaminantes en quesos frescos, se utilizaron métodos de rápida detección y métodos tradicionales normados. Realizando un comparativo entre ambos métodos. Mientras que para demostrar que los datos obtenidos son fiables, se homologaron en un laboratorio acreditado, validando así los resultados para cada microorganismo.

De Los resultados obtenidos se logra evidenciar presencia de *Salmonella* spp. en un 13.71% de los quesos analizados (8/51); para el caso de *Listeria*, se lograron detectar presencia en un 52.94%de los quesos analizados (28/51).

Con el estudio realizado se logra dejar evidencia de la inocuidad de los quesos frescos que son de mayor demanda. Lo cual permite, descubrir la susceptibilidad a la que se expone al consumidor.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	VI
ABREVIATURAS.....	VII
SIMBOLOGÍA.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
INTRODUCCIÓN.....	12
 CAPÍTULO 1	
1. MARCO TEÓRICO.....	18
1.1. Antecedentes.....	18
1.2. Evaluación de inocuidad de Quesos Frescos.....	21
1.3. Características generales de los microorganismos indicadores:	
Salmonella y Listeria.....	27
1.4. Criterio microbiológico de la normativa correspondiente de los	
microorganismos indicadores: Salmonella y	
Listeria.....	34
1.5. Características de cultivo y detección.....	40
1.6. Características ecológicas y epidemiológicas.....	60

1.7. Características de resistencia, control y prevención.....	95
1.8. Comportamiento de los patógenos indicadores.....	118
1.9. Objetivos Generales y Específicos.....	126

CAPÍTULO 2

2. DISEÑO METODOLÓGICO.....	128
2.1. Identificación del sector muestra.....	129
2.2. Toma de muestra base.....	134
2.3. Elección del método.....	141
2.3.1. Métodos de análisis y pruebas de detección.....	144
2.3.2. Medios de cultivo utilizados.....	159
2.4. Métodos de análisis estadísticos.....	168
2.5. Validación.....	170

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	171
3.1. Resultados a través de Pruebas de Rápidas Detección.....	182
3.2. Resultados a través de Métodos Convencionales.....	188
3.3. Homologación de las Pruebas Rápidas y los Métodos Convencionales.....	192
3.4. Análisis Estadístico.....	199
3.5. Análisis de la Normativa para Quesos Frescos.....	201

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... 208

APÉNDICES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

ETA	Enfermedades de Transmisión Alimentaria
AOAC	Sociedad Americana de Químicos Analistas
OMS	Organización Mundial de la Salud
MAGAP	Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca
FDA	Administración de Alimentos y Drogas
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Food
MSP	Ministerio de Salud Pública del Ecuador
INEC	Instituto Nacional de Estadística y Censos
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
g	Gramo
ml	Miligramo
L	Litro
NTE	Norma Técnica Ecuatoriana
NTC	Norma Técnica Colombiana
NMP	Número más probable
UFC	Unidad formadora de colonia
UPC	Unidad portadora de colonia

SIMBOLOGÍA

pH	Potencial de Hidrógeno
Aw	Actividad de agua
H.R	Humedad relativa

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Distribución zonal de la ciudad de Guayaquil.....	130
Figura 2.2	Percha de expendio comercial en supermercado.....	136
Figura 2.3	Evaluación sensorial de los quesos frescos.....	138
Figura 2.4	Kit de Rápida Detección para <i>Listeria</i>	154
Figura 2.5	Kit de Rápida Detección para <i>Salmonella</i>	157
Figura 3.1	Resultados de los análisis de las muestras de quesos frescos	182
Figura 3.2	Gráfico de barras con los resultados de los análisis por método de rápida detección.....	184
Figura 3.3	Análisis positivos para <i>Listeria</i> en quesos frescos por método de rápida detección.....	186
Figura 3.4	Gráfico circular con los resultados de los análisis por método de rápida detección para <i>Listeria</i>	186
Figura 3.5	Análisis positivos para <i>Salmonella</i> en quesos frescos por método de rápida detección.....	187
Figura 3.6	Gráfico circular con los resultados de los análisis por método de rápida detección para <i>Salmonella</i>	188
Figura 3.7	Gráfico de barras con los resultados de los análisis por método tradicional.....	189
Figura 3.8	Gráfico circular con los resultados de los análisis por método tradicional para <i>Listeria</i>	191
Figura 3.9	Gráfico circular con los resultados de los análisis por método tradicional para <i>Salmonella</i>	192
Figura 3.10	Casos notificados y tasa de intoxicación alimentaria en Ecuador.....	202
Figura 3.11	Casos y tasas de Salmonelosis	204
Figura 3.12	Tubos de verde brilla de las muestras de quesos de (a) marca “A” (b) marca “B” y (c) marca “C”. (Ver en apéndice)	
Figura 3.13	Tubos de agua de triptona con indol positivo para la muestra de queso de marca “B”. (Ver en apéndice)	
Figura 3.14	Placa con el crecimiento de <i>S. aureus</i> de la muestra de queso de marca “B”. (Ver en apéndice)	
Figura 3.15	Ausencia de <i>Salmonella</i> en placa para la muestra de queso de marca “A”. (Ver en apéndice)	

Figura 3.16 Presencia de *Salmonella* en placa para la muestra de queso de marca "B". (**Ver en apéndice**)

Figura 3.17 Presencia de *Listeria* en placas para las muestras de quesos de marcas "A" y "B". (**Ver en apéndice**)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Especie del género <i>Listeria spp.</i>	28
Tabla 2	Diferencias entre las especies del género <i>Listeria spp.</i>	29
Tabla 3	Principales toxiinfecciones alimentarias producidas por <i>L. monocytogenes</i> en el mundo a partir de 1981.....	69
Tabla 4	Límites de crecimiento para <i>Salmonella</i>	112
Tabla 5	Nivel de Concordancia según el valor de Kappa.....	169
Tabla 6	Número de muestras tomadas por cada supermercado.....	169
Tabla 7	Distribución de tipos de quesos que se comercializan en los supermercados.....	172
Tabla 8	Temperaturas en la percha de supermercados A.....	175
Tabla 9	Temperaturas en la percha de supermercados B.....	176
Tabla 10	Temperatura interna de los quesos de las diferentes marcas en el supermercado A.....	177
Tabla 11	Temperatura interna de los quesos de las diferentes marcas en el supermercado B.....	178
Tabla 12	Ph de los quesos frescos de las diferentes marcas en el supermercado A.....	179
Tabla 13	Ph de los quesos frescos de las diferentes marcas en el supermercado B.....	180
Tabla 14	Resultados de la evaluación sensorial de quesos frescos (parámetro color).....	181
Tabla 15	Resultados de la evaluación sensorial de quesos frescos (parámetro olor).....	181
Tabla 16	Resultados obtenidos en la comparación por método rápido y convencional para <i>Listeria</i> en quesos frescos (Samborondón).....	196
Tabla 17	Resultados obtenidos en la comparación por método rápido y convencional para <i>Salmonella</i> en quesos frescos (Guayaquil).....	198
Tabla 18	Resultados del análisis microbiológico de <i>E. coli</i> en las marcas de quesos frescos muestreados.....	205

Tabla 19	Resultados del análisis microbiológico de <i>S. aureus</i> en las marcas de quesos frescos muestreados.....	206
Tabla 20	Resultados del análisis microbiológico de mohos y levaduras en las marcas de quesos muestreados.....	207

INTRODUCCIÓN

En Guayaquil, el consumo de quesos frescos es masificado, mientras la producción y la comercialización del mismo se da artesanalmente hasta industrialmente. La elección del consumidor será siempre en función del lugar de expendio y el costo. Direccionando el muestreo a lugares de expendio que cumplan con las exigencias del consumidor.

La forma de ofrecer los alimentos a los consumidores no debe presentar alto riesgo sanitario, así como las condiciones en que se expenden dichos productos deben ser apropiadas, para que no favorezcan la contaminación microbiológica.

El Ministerio de Salud Pública (MSP) en el 2008 registró más de 10000 casos de intoxicaciones producidas por alimentos; pero no se cuantificaron por alimentos o por microorganismos indicadores.

Por esta razón, resulta de particular importancia tratar de determinar el impacto en el expendio de quesos frescos en supermercados de la ciudad de Guayaquil, los cuales no deben presentar índices de microorganismos patógenos. Los alimentos perecederos y los que requieren mucha manipulación, son los que se ven frecuentemente involucrados, entre ellos destacan los productos lácteos y cárnicos.

La calidad microbiológica de los alimentos que se expenden en la ciudad de Guayaquil se ha analizado en diferentes puntos de expendio. En este estudio se demostró que los sitios de preferencia para los consumidores hay incidencia de los microorganismos indicadores *Listeria spp.* y *Salmonella spp.* evidenciado el riesgo epidemiológico que representan.

En el capítulo uno, se recopila la reseña bibliográfica de los microorganismos indicadores *Listeria spp.* y *Salmonella spp.* En donde se recopila las condiciones para su resistencia, control y prevención. Se realiza un estudio de las normativas establecidas para quesos frescos. Además se recopilan datos de las ETA's producidas por quesos frescos.

En el capítulo dos se realiza el desarrollo metodológico en el cual se define el sector muestral, las condiciones físicas que presentan las muestras. Se logra estandarizar el método de muestreo para que estadísticamente sea válido.

Posteriormente, se hace el análisis para la elección del método de detección rápida y a su vez un comparativo con un método tradicional y normado. Se realiza un análisis estadístico de concordancia entre los dos métodos. Para aseverar estos resultados se validan los análisis con un ente acreditado y normado, determinando la fiabilidad de los datos obtenidos experimentalmente.

En el capítulo tres se exponen los resultados encontrados en todos los análisis realizados desde el punto de vista microbiológico y estadístico. En el cual se representan con tablas y gráficos, las tendencias obtenidas para cada análisis. Se demuestra estadísticamente la validez de los métodos utilizados, la concordancia entre los métodos rápidos y los tradicionales también se demuestra el incumplimiento de la norma partiendo de las especificaciones microbiológicas establecidas para los quesos frescos.

Por último, en el capítulo cuatro se detallan las conclusiones y recomendaciones de acorde con la evidencia encontrada en esta tesis.

CAPÍTULO 1

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 Listeria

El género *Listeria* recibe su nombre en honor del cirujano británico Lord Joseph Lister (ICMSF, 1996) y la especie *monocytogenes* por el síndrome de monocitosis presente en determinados enfermos de listeriosis.

En 1891, el investigador francés Hayen, describió por primera vez unos organismos pequeños Gram positivos con forma de

vara aislados de tejidos humanos. Dos años más tarde, en Alemania, Henle aisló unos organismos muy similares a los descritos por Hayen (Gray y Killinger, 1996). En 1911, Hülpers describió de nuevo la existencia de estos mismos organismos aislándolos de focos necróticos de hígado de conejo y los denominó *Bacillus hepatis*.

La caracterización completa de estos organismos fue realizada por Murray y col. (1926). El microorganismo fue aislado a partir de conejos y cobayas de laboratorio infectados que se desarrollaron lesiones hepáticas y monocitosis pronunciadas. A partir de este momento el microorganismo fue denominado *Bacterium monocytogenes*. Poco tiempo más tarde, Pirie (1940) logró aislar este microorganismo Gram positivo al que llamó *Listerella hepatolítica*.

La primera descripción de listeriosis en los humanos fue realizada por Nyfeldt en 1929 (Gray y col., 1966), el cual aisló esta bacteria a partir de sangre de pacientes que sufrían una enfermedad parecida a la mononucleosis infecciosa. En 1936, Burn, aisló el microorganismo de cadáveres de neonatos e implicó a la bacteria como causa de meningitis en adultos (Burn,

1936). En 1936 se reconoció por primera vez a *L. monocytogenes* como causa de infección humana durante el periodo perinatal y como responsable de meningitis en adultos. En 1940, y por razones taxonómicas, se adoptó la propuesta del nombre que actualmente conocemos: *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940).

El mayor brote epidemiológico de listeriosis en humanos descrito en Alemania entre los años 1949 y 1951 se relacionó directamente con el consumo de leche cruda (Seelinger, 1961; Gray y Killinger 1966). Hasta 1960 sólo se habían comunicado 500 casos de listeriosis en todo el mundo, alcanzando en 1981 la cifra de 10.100 (Ralovich, 1984). Al menos desde 1980 los cinco mayores brotes epidémicos de listeriosis humana asociados a los alimentos se han encontrado principalmente en las áreas geográficas de Europa y América del Norte, de los cuales lo más destacados fueron en 1981, en Canadá; en 1983 en Massachusetts (E.E.U.U); entre 1985 y 1987 en Suiza; y en 1992 en Francia.

El Centro de Transferencia de Tecnología e Investigación Agroindustrial “CETTIA” de la Universidad Técnica Particular de Loja en los años 2007 y 2008 realizó dos investigaciones con un producto lácteo de interés por su importancia en la dieta básica de la población de la región sur del Ecuador “el quesillo”. En el primer estudio se analizó 42 muestras de quesillo, dando como resultado que el 83.3% de las muestras estuvieron contaminadas con *E. coli*. En el segundo estudio se analizaron 120 muestras, de las cuales el 65.8% presentó contaminación por *Staphylococcus Aureus*, el 28.3% *Levaduras* y el 15.8% *Listeria spp.*

Todas las muestras de quesillo se obtuvieron de los mercados de la ciudad de Loja. (Diario Hoy, 2009)

1.1.2 Salmonella

En el año de 1874, Budd fue el primero en relacionar que las fiebres tifoideas habían sido transmitidas por el agua y los alimentos. *Salmonella Typhi*, agente etiológico de la enfermedad, fue descubierta en el año de 1884 por Gaffky. *Salmonella Choleraesuis* fue aislada de un cerdo en el que diagnosticó la cólera del cerdo (ICMSF, 1996).

El nombre del género fue acuñado por Ligniers en el año 1900 en honor a los trabajos realizados por el doctor D. E. Salmon, bacteriólogo americano que caracterizó los bacilos causantes del cólera del cerdo.

La primera vez que un laboratorio confirmó un brote de toxoinfección alimentaria provocado por salmonelosis, se vieron implicados 57 personas que comieron carne de un animal enfermo. *Salmonella* enteritidis fue aislada de los órganos de una de las personas fallecidas y de la carne y la sangre del animal (ICMSF, 1996). Desde entonces, la *Salmonella* ha sido reconocida como la mayor causante de fiebres entéricas y gastroenteritis.

En una investigación realizada en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Zootécnica de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, se encontró que de 40 muestras de leche sin pasteurizar de vendedores ambulantes del sector, 19 resultaron positivas con patógenos. De las 19 muestras positivas, 11 presentaron *S. aureus*, 7

presentaron *Salmonella* y 1 presentó *Shigella*. (Diario Hoy, 2009).

1.2 Evaluación de la inocuidad de los Quesos Frescos en percha

El tratamiento térmico es la clave para los productos lácteos seguros y saludables. Los tratamientos térmicos engloban todos los procedimientos que tienen entre sus fines la destrucción de microorganismos por el calor, por tanto el objetivo final del tratamiento térmico que se aplique a la leche irá enfocado a destruir la flora natural bacteriana que provoca el deterioro de la leche, manteniendo sus propiedades nutricionales.

La leche no pasteurizada y los productos elaborados con leche no pasteurizada están a la venta y son nocivos para la salud. Para que estas bacterias patógenas no generen una toxiinfección, el consumidor debe poseer criterio para poder elegir cuidadosamente la leche y los productos derivados.

Es importante aclarar que un riesgo adicional de la leche que no ha recibido control sanitario, y que no es eliminado con la pasteurización

en el hogar, lo constituye la presencia de contaminantes químicos que afectan indirectamente a la salud del consumidor tales como:

1. Residuos de antibióticos que hubieran sido administrados a las vacas a fin de tratar alguna patología, como la mastitis.
2. Residuos de plaguicidas y otras sustancias tóxicas.

La recomendación final es que “consuma leche pasteurizada o sus subproductos” los cuales son ofrecidos por diversas empresas productoras y que se encargan de la elaboración y envasado de leche para consumo realizando el proceso de pasteurización y otros controles sanitarios que garantizan que el producto final cumpla con reglamentaciones correspondientes y sean inocuos para el consumidor.

El queso fresco es el producto que se obtiene por la separación del suero de la leche entera, parcial o totalmente descremada, coagulada por acción del cuajo u otros coagulantes apropiados. Esta listo para el consumo después de la fabricación y no será sometido a ningún cambio físico o químico adicional.

1.2.1 Requisitos de los Quesos Frescos

A la hora de la compra u elección de los quesos frescos es muy importante tener en cuenta que el envase, recipiente, empaque o embalaje en el cual se halla contenido el alimento no este roto, mojado, abollado, oxidado, pinchado o abierto por ningún motivo. Otro punto a tener en cuenta es leer bien la información contenida en los rótulos (etiqueta). En cuanto a la conservación es importante considerar los siguientes puntos:

- Duración del producto o vencimiento: Las fechas de vencimiento indican la vida útil del alimento envasado.
- La declaración de las mismas es obligatoria, y comprenden el período dentro del cual el alimento mantiene su inocuidad y/o características organolépticas (olor, color, etc.).
- A partir del día siguiente al indicado ese alimento no debe ser consumido y esta terminantemente prohibida su venta.

- Condiciones de almacenamiento: nos indica cuál es la temperatura y características del ambiente al cual debemos mantenerlos para asegurar su estabilidad.

1.2.2 Requisitos Generales de los Quesos Frescos

- Forma

El queso común presentará bordes regulares y caras lisas; mientras que el queso fresco extra húmedo tendrá la forma determinada por su envase.

- Apariencia

El queso fresco debe presentar textura suave, no esponjosa y su color puede variar del blanco a crema. Debe estar libre de colorantes. Su color y sabor deben ser los característicos del queso fresco.

1.2.3 Requisitos de la fabricación

- Materia prima

El queso fresco debe fabricarse con leche cruda sometida al proceso de pasteurización, proveniente de animales sanos.

- **Proceso**

El queso fresco deberá elaborarse en condiciones higiénico-sanitarias adecuadas y con buenas practicas de manufactura, que permitan reducir al mínimo la contaminación microbiana perjudicial.

1.2.4 Aditivos e ingredientes

En la elaboración del queso fresco común pueden emplearse los siguientes e ingredientes:

- a) Fermento láctico
- b) Cuajo u otras enzimas adecuadas
- c) Cloruro de sodio
- d) Cloruro de calcio, con un máximo de 0,2 g/litro de leche empleada
- e) Especies, en cantidades tecnológicamente adecuadas

1.2.5 Requisitos Complementarios

- **Envasado**

El queso fresco debe acondicionarse en envase cuyo material sea resistente a la acción del producto y que no altere las características organolépticas del mismo.

- Rotulado

El rótulo o la etiqueta del envase debe incluir la siguiente información:

- I. Designación del producto y tipo
- II. Marca comercial
- III. Identificación del lote
- IV. Razón social de la empresa
- V. Contenido neto en unidad del SI
- VI. Número de Registro sanitario
- VII. Fecha del tiempo máximo de consumo
- VIII. Listas de ingredientes
- IX. Precio de venta al público
- X. País de origen
- XI. Forma de conservación
- XII. Norma técnica INEN de referencia

1.3 Características generales de los microorganismos indicadores

1.3.1 *Listeria*

Según lo descrito en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9ª edición (1994), la *Listeria* son bacilos de forma regular y con forma de vara corta de aproximadamente 0,4-0,5 μm de longitud con las puntas redondeadas. Algunas veces pueden tener forma cocoide, apareciendo como células individuales de cadenas cortas.

Pueden ser móviles cuando se cultivan a temperaturas de 20 a 25 °C y ésta movilidad está provocada por la presencia de tres o cuatro flagelos de implantación periférica. Estos flagelos pueden tener longitudes de 6 a 20 μm o más.

La morfología de las colonias que han crecido en medios nutritivos sólidos (agar) a las 24-48 horas son de un tamaño de 0,5 - 1,5 mm de diámetro, redondeadas, translúcidas con apariencia de gota de rocío, ligeramente convexas con la superficie fina y el margen entero. Las colonias tienen un color gris azulado con la luz normal y un color azul verde brillante con la luz oblicua (ICMSF, 1996). Cuando los cultivos en medios sólidos de agar son viejos

de 3 a 7 días, las colonias son mas grandes, de 3 a 5 mm de diámetro, con una zona central mas opaca y con un aspecto más áspero y rugoso.

Las bacterias del género *Listeria* son microorganismos Gram positivos que tienen un metabolismo aeróbico y anaerobio facultativo. Son oxidasa negativas, rojo de metilo positivo. Voges-Proskauer positivo, no utilizan el citrato exógeno, no producen indol y no hidrolizan ni la urea ni la gelatina ni la caseína. No producen H₂S y no reducen los nitratos a nitritos. Todas sus cepas producen fosfatasa alcalina.

Se admiten cinco especies claramente diferenciables: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii*; mientras que *L. denitrificans*, *L. grayi* y *L. murrayi* se clasifican como especies incertae sedis, de clasificación incierta. Trabajo recientes han determinado que *L. denitrificans* no pertenece al género, y ha sido clasificada de nuevo como *Jonesia denitrificans*. Sin embargo, *L. grayi* y *L. murrayi* permanecen dentro del género, aunque se han

considerado que no son lo suficientemente diferentes como para garantizar el que sean especies separadas, por lo tanto, han sido clasificadas de nuevo como única especie para la que se ha propuesto el nombre de *L. grayi*. Finalmente, *L. ivanovii* consta de dos subespecies: *L. ivanovii* subespecie *ivanovii* y *L. ivanovii* subespecie *londoniensis* (Bell y Kyriakides, 1998). Por lo tanto, según la información más reciente, el género *Listeria* está constituido por las especies que aparecen en la Tabla 1.

TABLA 1.
ESPECIE DEL GÉNERO *LISTERIA* SPP.

Especies de <i>Listeria</i> spp	Nombre anterior de la especie
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacterium monocytogenes</i>
<i>Listeria innocua</i>	
<i>Listeria welshimeri</i>	
<i>Listeria seeligeri</i>	
<i>Listeria grayi</i>	<i>Listeria Grayi, Listeria murrayi</i>
<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria ivanovii</i>
subespecie <i>ivanovii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
subespecie <i>londoniensis</i>	serovariedad 5

Fuentes: World Journal of microbiology and Biotechnology

Las diferentes especies de *Listeria* se pueden diferenciar entre ellas por su capacidad de fermentar carbohidratos y por su capacidad β – hemolítica, tal y como se especifica en la tabla 2.

TABLA 2
DIFERENCIAS ENTRE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *LISTERIA*
SPP.

Especies <i>Listeria</i>	Fermentación de carbohidratos			CAMP SA	TEST RE	Hemolisis
	M	R	X			
<i>L. monocytogenes</i>	-	+	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	-	-	+	+	-	+
<i>L. ivanovii</i>	-	-	+	-	+	+
<i>L. grayi</i>	+	V	-	-	-	-

[M, manitol; R, L-rhamnosa; X, D-xilosa. “+” fermenta el azúcar en cuestión y produce gas, “v” puede o no fermentar el azúcar en cuestión y “-” no fermenta el azúcar en cuestión ni produce gas. CAMP-test (CHRISTIE, ATKINS; MUNCH-PETERSEN fenómeno): *L. monocytogenes* muestra una zona hemolítica típica en las placas de sangre cuando se cultivan junto a *Staphylococcus aureus* β -hemolítico (SA) y/o *Rhodococcus equi* (RE)].

Fuentes: World Journal of microbiology and Biotechnology

1.3.2 *Salmonella*

Salmonella es un género de la familia de las Enterobacteriaceae (Brenner, 1984). Los miembros de esta familia se caracterizan por ser Gram negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, bacterias con forma de barra y con las puntas redondeadas. Las formas móviles tienen flagelos de implantación periférica. *Salmonella* es normalmente móvil, pero *S. pullorum*, *S.gallinarum* y un serotipo de *S. arizonae* no son móviles. La mayoría de las cepas, a excepción de *S. typhi*, son aerógenas.

Producen ácido y a veces gas a partir de la glucosa, raramente fermentan la lactosa o la sacarosa. Son normalmente catalasa positivas y oxidasa negativas y reducen los nitratos a nitritos. La reacción del rojo de metilo es positiva, el test Voges-Proskauer es negativo y la reacción del Indol es negativa. Lisina descarboxilasa positiva, la fermentación del dulcitol es positiva, el crecimiento en caldo KCN es negativo, la utilización de

malonato de sodio es negativa. No desaminan la fenilalanina, no hidrolizan la urea, no licúan rápidamente la gelatina en nutrientes y no producen DNAsa ni lipasa. El citrato es utilizado normalmente como única fuente de carbono (ICMSF, 1996; NF ISO 6579, 1993).

La mayoría de los miembros de esta familia se encuentran en el tracto intestinal de los humanos y de los animales ya sea como patógenos o como comensales.

Según lo descrito en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9ª edición (1994) el género *Salmonella* se subdivide en cinco subgéneros distintos se basa no solo con la hibridación DNA/DNA. Así pues, una homología del DNA >70% quiere decir que las bacterias pertenecen a la misma especie, mientras que la caracterización de los diferentes subgéneros de *Salmonella* se basa no solo con la hibridación DNA/DNA, sino también en las características bioquímicas y en las formas de aislamiento que son utilizadas habitualmente.

Al subgénero I pertenecen las *salmonellas* típicas patógenas aisladas del contenido intestinal de los animales de sangre caliente y que son la mayoría. Al subgénero II y III pertenecen aquellas que se han aislado de animales de sangre fría, tales como *S. salamae* y *S. arizonae*. Al subgénero IV y V pertenecen todas aquellas que se encuentran mayoritariamente en el medio ambiente y que raramente se han identificado como patógenas para el hombre.

Después de la clasificación en subgéneros, la clasificación más importante del género *Salmonella* se basa en características serológicas de la bacteria de acuerdo al esquema de Kauffman-White, el cual fue concebido por White y desarrollado por Kauffman (ICMSF, 1996). La serología se basa en los antígenos somáticos O, el antígeno flagelar H y el antígeno capsular Vi. De esta forma se pueden identificar hasta 2.200 serovares diferentes de *Salmonella* describiéndolos por una serie de números y letras que representan a 64 antígenos O,H y Vi diferentes.

Finalmente, cada serovar se puede subdividir según sus características bioquímicas (biovares y biotipos), su resistencia a los bacteriófagos (fagovares o lisotipos), su resistencia a los antibióticos o a los metales pesados por su sensibilidad a las bacteriocinas o por la producción de bacteriocinas. Todas estas características son dependientes del DNA extracromosómico que normalmente se mantiene estable durante todo el periodo que dura un brote infeccioso.

1.4 Criterio Microbiológico de la normativa correspondiente a los microorganismos indicadores.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) manifiesta que la inocuidad de los alimentos engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Las políticas y actividades que persiguen dicho fin deberán de abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo. De acuerdo a lo establecido por el Código Alimentarius, la inocuidad es la garantía de

que un alimento no causará daño al consumidor cuando el mismo sea preparado o ingerido de acuerdo con el uso a que se destine.

Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) del Ecuador , la disponibilidad de leche cruda para consumo humano e industrial representa alrededor del 76% de la producción bruta. La leche fluida disponible se destina en un 25% para elaboración industrial (19% leche pasteurizada y 6% para elaborados lácteos), 74% entre consumo y utilización de leche cruda (49% en consumo humano directo y 25% para industrias caseras de quesos frescos), y aproximadamente un 1% se comercializa con Colombia en la frontera.

Muchos gobiernos a nivel mundial prohíben la venta de leche cruda (sin pasteurizar) al público, por ejemplo: Estados Unidos, Canadá, Argentina, Chile, Venezuela, etc.

De acuerdo con los centros para la prevención y el control de las enfermedades, desde 1998 más de 800 personas en los Estados Unidos se enfermaron por beber leche sin pasteurizar o por comer queso elaborado con esta leche. El Center Food Safety and Applied Nutrition de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) menciona

que la leche sin pasteurizar puede transportar peligrosas bacterias que son responsables de muchas enfermedades de origen alimentario.

Debido a la gran variedad de alimentos destinados al consumo humano y productos para consumo animal, los métodos de referencia en las normas puede no ser apropiado en todos sus detalles para algunos productos para los cuales puede ser necesario utilizar métodos distintos o específicos. Sin embargo, en cualquier caso, debe tratar de aplicarse este método horizontal en todo lo posible y las variaciones al mismo deberán realizarse únicamente si es absolutamente necesario por razones técnicas justificadas. Cuando las normas de referencia sean actualizadas, se tendrá en cuenta toda la información disponible en ese momento en cuanto a la utilización de este método horizontal y las razones de posibles variaciones al mismo en productos específicos.

1.4.1 Listeria

Para estimar el riesgo de contraer listeriosis en una población, debe tenerse en cuenta la prevalencia del patógeno en los alimentos existentes en el mercado, especialmente en aquellos listos para el consumo. En

Ecuador, la vigilancia de este patógeno no se exige para alimentos de consumo interno, debido a que no está incluido en el Reglamento Sanitario de los Alimentos (Ecuador, 2009), sólo para los alimentos de exportación, donde la entidad fiscalizadora es una auditoría interna, regularizado por las leyes del país al que se desea exportar, en la mayoría de los casos es la FDA.

Sin embargo, los estudios realizados entre 1990 y 2000 en alimentos del mercado demuestran presencia de *L. monocytogenes* en productos cárnicos procesados (3,6%), mariscos (11,6%), helados (3,6%) y queso crema (0,8%) (Cordano y Roccourt, 2001). En la Universidad Técnica Particular de Loja se determinó la presencia de la bacteria en un 40 % de 25 muestras de queso fresco.

La norma técnica ecuatoriana INEN 1528 para quesos frescos no enfatiza ninguna restricción en cuanto a la presencia o ausencia para *Listeria*. Solo hay una frase interpretativa que indica que el producto deberá estar

exento de otros patógenos. Tampoco hay un método de identificación y aislamiento, por lo cual se toma como referencia una normativa que se familiariza con nuestro país, escogiendo la Norma Técnica Colombiana NTC 4666.

La norma técnica colombiana, ofrece métodos para la identificación y aislamiento para *Listeria*, basándose en cuatro principios: Pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo, identificación y aislamiento y la confirmación.

El nivel de *L. monocytogenes* tolerado en los países es muy variable y va de tolerancia 0 en 25 g en EE.UU. hasta permitir la presencia de 100 UFC/g en algunos países de la Unión Europea.

El Código Alimentario Argentino exige en quesos de mediana, alta y muy alta humedad ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g de muestra. Asimismo, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) establece la investigación de *L. monocytogenes* en salchichas tipo Viena y/o chacinados y/o salazones cocidos feteados y otros productos cocidos. Numerosos investigadores, incluyendo la ICMSF, proponen un valor

objetivo de inocuidad alimentaria no mayor de 100 UFC/g al momento del consumo.

A pesar de los ingentes esfuerzos realizados a la fecha este microorganismo constituye aun un desafío que el hombre deberá vencer en un futuro muy cercano.

1.4.2 Salmonella

La Unión Europea y USA más de 30.000 brotes investigados, que involucran un total de 391.383 casos. En aproximadamente 23.538 brotes se identificó el agente causante *Salmonella* es responsable del 77,1% de ellos. En más de la tercera parte de estos se confirmó que la causa era *S. enteritidis*. Otros agentes *Staphylococcus aureus* (4%), *Trichinella* (3%), *Shigella* (3%), *Clostridium* (2%), hongos tóxicos (2%), *Campylobacter* (1%), virus (1%) y otro (7%).

Las ETA's constituyen un importante problema de salud pública en la región de las Américas por su magnitud, la emergencia de patógenos y el impacto social y económico.

Para el patógeno *Salmonella* la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1528 dispone que en 25 gramos se debe reportar ausencia. Y con la comparación de otras normas internacionales, este criterio es igual. La diferencia radica en diversos métodos para la identificación y aislamientos.

1.5 Características de cultivo y detección de los microorganismos

1.5.1 *Listeria*

Practicamente todas las cepas de *Listeria* son catalasa positivo cuando crecen en medios de cultivo y bajo condiciones de laboratorio normales y habituales, pero pueden dar reacciones negativas si se cultivan en medios que contengan concentraciones bajas de carne o extracto de levadura. La actividad catalasa de las listerias está deprimida cuando los medios de cultivo contienen altas concentraciones de glucosa, es decir, valores del 10% p/v (ICMSF,1996).

Fermentan la glucosa transformándola mayoritariamente en L(+)-ácido láctico y también fermentan otros azúcares

(como la amigdalina, celubiosa, esculina, fructosa, manosa y salicina) en 48 horas dando ácidos pero no gas. Todas las cepas producen β -D-galactosidasa. Las bacterias del género *Listeria* no hidrolizan ni la celulosa, ni la tirosina ni la xantina. Por lo tanto, los carbohidratos son esenciales para el crecimiento de *Listeria* siendo la glucosa el carbohidrato de elección. La adición de glucosa en un medio de cultivo de enriquecimiento es esencial para obtener crecimientos óptimos del microorganismo. Así ocurre con la adición de esculina en el medio como única fuente de carbohidratos (Swaminathan y col., 1988).

Las cepas de *Listeria* tienen ciertos requisitos nutricionales para su crecimiento. Suplementos de ClNa en un mínimo de un 3% y un máximo de 10% (Iriarte y col., 1993) y de ácidos biliares en un 40% (ICMSF, 1996) en los caldos de cultivos que favorecen el crecimiento de *Listeria*. También crecen en presencia de 0,025% de acetato de talio; 3,75 de tiocianato potásico y 0,01% de 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolium (ICMSF, 1996). El tiocianato potásico ha sido incorporado

en medios de cultivo de enriquecimiento como agentes selectivos para la recuperación de bacterias de la especie *L. monocytogenes* (Golden y col., 1987).

La utilización de un 0,04% de telurito potásico en los medios de cultivo inhibe el crecimiento de un amplio espectro de especies de microorganismos Gram negativos (ICMSF, 1996; Buchanan y col., 1987). La adición de 40 µg/ml de ácido nalidíxico en el medio de cultivo selectivo de enriquecimiento para la *Listeria* a resultado ser muy útil para inhibir el crecimiento de los microorganismos contaminantes Gram negativos (Donnelly, 1987; Buchanan y col., 1987; Swaminathan y col., 1988) y como agente selectivo para la recuperación de *L. monocytogenes* (Golden y col., 1987). Así mismo, la adición de 50 µg/ml de acriflavina en el mismo medio de cultivo inhibe el crecimiento de los microorganismos contaminantes Gram positivos (Donnelly, 1987) e inhibe específicamente el crecimiento de los cocos Gram negativos y positivos (Swaminathan, 1988).

Se ha observado que la utilización de feniletanol, glicina y cloruro de litio en los medios de cultivo para el género *Listeria* es un eficaz sistema de inhibición del crecimiento de la mayoría de las bacterias gram positivas y negativas,. Sin afectar de forma apreciable la recuperación de *L. monocytogenes* (Golden y col., 1987).

La utilización simultánea de moxalactamo, bacteriocinas y ácido nalidíxico es una combinación efectiva de agentes selectivos que dan apoyo al crecimiento de *Listeria*, mientras provocan la supresión del crecimiento de otras especies, incluso *Staphylococcus aureus* (Buchanan y col., 1987).

Todas las cepas de *Listeria* son sensibles a numerosos antibióticos. Así mismo, gran número de cepas de *Listeria* producen bacteriocinas (ICMSF, 1996) que no inhiben a las bacterias Gram negativas, pero que sí son activas contra la mayoría de los bacilos y de los *Staphylococcus*.

Algunas de las especies del género *Listeria* son β -hemolíticas en agar sangre. Esta actividad hemolítica se demuestra con la aparición de zonas de hemólisis en sangre, de mayor o menor tamaño en función de la especie de *Listeria* que se trate, alrededor de la colonia una vez cultivada en el agar sangre. Una actividad β -hemolítica débil o bien dudosa puede solucionarse con la utilización del CAMP test que potencia la actividad hemolítica de la *Listeria* (ICMSF, 1996).

L. innocua y *L. monocytogenes* comparten el mismo hábitat ecológico, los mismos requerimientos fisiológicos y pueden crecer perfectamente en medios selectivos corrientes de *Listeria*, produciendo colonias que morfológicamente son indistinguibles. Bajo estas circunstancias, *L. monocytogenes* puede ser encubierta y, por lo tanto, no se detecta. Un estudio realizado por Blanco y col. (1989) basado en la adición de células rojas en el medio de cultivo selectivo (“Técnica de la sobrecapa”) ha permitido detectar la actividad hemolítica de las colonias patógenas de *Listeria*

“*in situ*” en el agar selectivo de aislamiento, sin más subcultivos posteriores.

Las colonias de *Listeria* visualizadas mediante este método tienen la morfología típica con un halo negro alrededor debido a la hidrólisis de la esculina, y con un pico negro en el centro debido a la reducción del telurito.

Mioni y col.(1998) desarrollaron un medio de cultivo que diferencia entre *L. innocua* y *L. monocytogenes*. Se basa en la puesta de evidencia de la fosfolipasa C, específica para el fosfatidilinositol, característico solamente de la especie patógena, lo que se traduce en el medio de cultivo selectivo ALOA es una colonia de color negro con un halo opaco alrededor, que permite determinar la colonia como presuntamente *L. monocytogenes*, incluso cuando hay una flora mixta de fondo.

Los componentes selectivos del medio ALOA son el cloruro de litio, particularmente eficaz frente a las bacterias del género *Bacillus*, y una combinación de sustancias antimicrobianas que limitan el crecimiento de las

poblaciones de microorganismos contaminantes. El primer compuesto diferencial es el cromógeno 5-bromo, 4 cloro, 3 indolil, β -D-glucurónico (X-GLUC o BCIG) que actúa como sustrato para la enzima β -glucosidasa, el cual está presente en todas las especies del género *Listeria*. La ruptura de la unión β determina la liberación del cromógeno dando lugar a una coloración verde-azul.

La puesta en evidencia de la patogenicidad de la especie en cultivo en placa se debe al factor de virulencia, fosfolipasa C, que permite a la *L. monocytogenes* crecer en el interior de células huésped (también presente en *L. ivanovii*) manifestándose en el medio de cultivo sólido con la producción de un halo opaco en torno a la colonia. El aislamiento de *L. ivanovii* es muy raro en los alimentos y es considerado patógeno para los animales y solo excepcionalmente para el hombre.

En la práctica del laboratorio la búsqueda de *L. monocytogenes* cuenta con una diversidad de caldos de enriquecimiento y de medios de aislamiento, que hace

compleja la elección del método más idóneo a emplear. Así, podemos encontrarnos con el método L-Palcam (NGFIS; Netherlands Government Food Inspection Service), el método Fraser (AFNOR; Association Française de Normalisation) o bien con el método LEB (FDA; Foods and Dregs Administration). Aguado y col. (1997), recuperaron con el método L-Palcam un mayor número de *L. monocytogenes* en los vegetales congelados y en los productos cárnicos cocidos. Sin embargo, en el salmón ahumado el método más eficaz fue el Fraser. Respecto a la *Listeria spp.*, por el método Fraser obtuvieron el mayor número de aislamientos (84,2%), seguido del método L-Palcam (55,3%) y, en último lugar, el método LEB (36,8%). En el caso del salmón ahumado, recuperaron el 100% de las cepas de *Listeria spp.* Por el método Fraser.

Estos autores apuntaron una mayor eficacia de los caldos L-Palcam y Fraser para la recuperación de *L. monocytogenes* en los alimentos, aunque su grado de recuperación varía en función del tipo de alimento. Para la recuperación de especies del género *Listeria* en general, el caldo más eficaz

resultó ser el método Fraser con independencia del alimento analizado.

El sistema de recuperación LEB facilita la recuperación de especies de *Listeria* en muestras ambientales y de alimentos, lo que permite detectar e identificar provisionalmente el organismo analizado en un plazo de 27 horas para las muestras de alimentos y de 24 horas para ambientales. A través de la evaluación por la AOAC Research Institute, esta prueba se ha demostrado que detectar *Listeria* en los siguientes alimentos: leche pasteurizada, queso cottage, queso fresco, queso parmesano, helado, lechuga y jamón.

Este análisis se ha diseñado para su uso por personal familiarizado con las técnicas asépticas apropiadas que permiten aislar e identificar especies de *Listeria*. Se recomienda la capacitación de las personas carentes de conocimientos básicos de microbiología.

Golden y col. (1987) utilizaron con buenos resultados el procedimiento de siembra directa en placa sin el

enriquecimiento previo para recuperar *L. monocytogenes* de alimentos como la leche y las mezclas de helado, los cuales contienen niveles bajos de población microbiana de fondo. Para la recuperación de *L. monocytogenes* a partir de alimentos como la calabaza cruda y el queso tipo Brie, que contienen elevadas poblaciones de otros microorganismos, no es tan satisfactorio el uso de este procedimiento de siembra directa en placa.

El procedimiento de siembra directa en placa puede ser utilizado para la recuperación y recuento de poblaciones de *L. monocytogenes* con unos niveles de población de hasta 10^2 ufc/ml ó g cuando las poblaciones de micro flora de fondo son escasas, aunque no es eficaz cuando son altas.

La incubación de las muestras a 4°C inhibe el crecimiento de la mayoría de los microorganismos mientras que permite la proliferación lenta de *L. monocytogenes*. Por lo tanto, el enriquecimiento en frío es esencial para el proceso selectivo de las cepas de *Listeria*. Pero si son incorporados ciertos agentes selectivos en el medio de enriquecimiento, el almacenamiento en frío ya no es necesario para el cultivo

del microorganismo, acortándose de este modo el periodo de enriquecimiento. Por esta razón, el ácido nalidíxico y el tiocianato potásico han sido incorporados en los medios de enriquecimiento como agentes selectivos para *L. monocytogenes* (Golden y col., 1987).

El método de enumeración para la *Listeria spp.* Ha sido difícil de desarrollar (Blysick-Mckennal y Schaffner, 1994) debido a la baja concentración de *Listeria spp.* y a la alta concentración de la flora competitiva que se encuentra en los alimentos. El método del número más probable (NMP) se utiliza normalmente para la determinación de coliformes en alimentos, y es útil cuando hay un número bajo de microorganismos.

Para la identificación de la *L. monocytogenes* se puede utilizar el sistema comercial API el cual identificó el 85% de las especies y subespecies de *Listeria* sin necesidad de tests complementarios (Bille y col., 1992). Este test diferencia *L. monocytogenes* de *L. innocua* basándose en la presencia o ausencia de la arilamidasa (DIM test), la

hidrólisis de la esculina, la presencia de α -manosidasa, y la producción de ácido a partir de D-arabitol, D-xilosa, L-rhamnosa, α -metil-D-glucosa, D-ribosa, glucosa-1-fosfato y D-tagatosa, y, finalmente, a partir de la hemólisis que distingue *L. monocytogenes* (hemolítica y patógena) de *L. innocua* (no hemolítica y no patógena), las cuales son las dos especies mayoritarias aisladas más frecuentemente a partir de los alimentos. Este sistema reduce considerablemente el tiempo necesario para la identificación convencional, dando resultados fiables a partir de las 18 a 24 horas. Tradicionalmente las pruebas serológicas no se han utilizado para identificar *Listeria*. Han sido poco fiables, carentes de sensibilidad y de especificidad. Se han intentado sin éxito varios formatos, incluyendo la técnica ELISA, la fijación del complemento y la microaglutinación, en el diagnóstico de casos de listeriosis humana demostrada en cultivo, incluso en ausencia de inmunosupresión. Se ha observado una considerable reacción cruzada con determinantes antigénicos de otros organismos Gram-positivos.

Se ha descrito la prevalencia de anticuerpos séricos anti-*L. monocytogenes* en un nivel tan alto como del 53%. El nivel de portadores en los animales es similar al de humanos, con algunas diferencias dependiendo de la especie. El descubrimiento reciente de que la hemolisina de *L. monocytogenes*, la listeriolisina O (LLO), es el principal factor de virulencia y que puede estimular una respuesta de anticuerpos, ha hecho reanudar el interés acerca de la posibilidad de utilizar las pruebas serológicas para el diagnóstico de la listeriosis. En el diagnóstico de la listeriosis experimental de ovejas se aplica un ELISA indirecto basado en la detección de los anticuerpos anti-LLO. Sin embargo, la LLO está relacionada antigénicamente con varias citolisinas, entre ellas la estreptolisina O (SLO) de *Streptococcus pyogenes*, la pneumolisina de *S. pneumoniae* y la perfringolisina de *Clostridium perfringens*. Los problemas de reactividad cruzada de los anticuerpos anti-LLO con las citolisinas, particularmente con la SLO y la pneumolisina, han obstaculizado el desarrollo de pruebas

serológicas específicas y fiables basadas en la detección de anticuerpos anti-LLO.(Andrews, 2002)

Para la detección serológica de *Listeria* spp. El método con mayor sensibilidad es REVEAL 2.0 LISTERIA, donde se detecta el antígeno específico de *Listeria* de estar presente en la muestra. La Listeriolisina O es entre las citolisinas, la única producida por una bacteria intracelular, además es activa a bajos pHs como los que imperan en el interior del fagolisosoma. Además, esta hemolisina es responsable de la hemólisis tipo β que sirve para identificar a *L. monocytogenes* en agar sangre. A este respecto, diversos trabajos han demostrado que las escasas cepas no hemolíticas de este patógeno suelen ser no virulentas debido a que aunque llegan a invadir las células, son incapaces de escapar de la vacuola fagocítica al no tener LLO.(AFNOR, 2000).

La forma de interacción con esta prueba serológica y la muestra, se evidencia con coloraciones en láminas de

nitrocelulosa. La ventaja de la nitrocelulosa es un material inerte que no reacciona.

En la cual hay una línea de reacción producida por la interacción de las partículas de Látex azul con un inactivador específico para estas partículas de Látex Azul. Produciéndose una zona de reacción. Originando una línea de control. Mientras que para poder evidenciar la línea de positividad, se debe formar un complejo, con el antígeno y el anticuerpo específico para *Listeria*, junto con las partículas de Látex azul. Este complejo viaja por una lámina de nitrocelulosa. Donde se encuentra con un inactivador específico del anticuerpo para *Listeria*. Formando un complejo inocuo. Donde se encuentra conformado solo por las partículas de Látex Azul y el antígeno de *Listeria*. Este complejo es el responsable de la coloración azul, logrando a su vez la línea que refleja el positivo de la prueba.

1.5.2 Salmonella

En los procedimientos de detección de *Salmonella* hay una serie de pasos que se deben seguir. Incluyen un pre enriquecimiento en medio líquido, un enriquecimiento en medio líquido, una diferenciación selectiva en placa, un aislamiento, una caracterización bioquímica y finalmente, una confirmación serológica de la bacteria aislada (D'Aoust y col., 1992b; NF ISO 6579, 1993). El pre enriquecimiento de la muestra alimenticia se realiza en un caldo de cultivo no selectivo para facilitar la recuperación de los daños o estrés que haya sufrido la bacteria que se encuentra en los alimentos crudos y procesados. El enriquecimiento selectivo directo (sin pre enriquecimiento) y el posterior recuento directo de la bacteria se puede realizar en aquellas muestras de alimentos que sabemos que son sospechosos o que conozcamos el contenido de microorganismos (D'Aoust y col., 1992a). Para esta fase se utilizan los caldos de lactosa o aguas de peptonas que son los medios preferidos por las agencias americanas e internacionales (D'Aoust, 1980), los cuales no tienen función de inhibir, sino

que permiten el crecimiento de toda la flora microbiana presente en la muestra incluyendo a *Salmonella*.

El proceso de enriquecimiento está diseñado para inhibir el crecimiento de otros organismos diferentes a la *Salmonella* potenciando así su crecimiento, que se consigue mediante la utilización de inhibidores químicos, como el selenito y el tetrionato, y con temperaturas de incubación de 41°C-43°C durante 16 a 24 horas. Normalmente se utilizan caldos selectivos que incluyen en su composición tetrionato con verde brillante (TBG), selenito con cisteína (SC), y cloruro magnésico verde malaquita de Rappaport- Vassiliadis (RV) que favorecen el crecimiento de *Salmonella* spp. y provocan la represión de la microflora competitiva (D'Aoust y col., 1992a, 1992b, 1995; NF ISO 6579, 1993). Las condiciones de tiempo y temperatura aplicados durante esta fase de enriquecimiento son más críticos que los elegidos en los medios de pre enriquecimiento no selectivo (D'Aoust y col., 1992a, 1992b).

En los productos del pollo contaminados naturalmente, la mejor combinación para asegurar la máxima recuperación de las cepas de *Salmonella* es la utilización del caldo RV (Rappaport-Vassiliadis) y caldo KIMAN (Whitley Impedance Broth suplementado con 20 mg/l de sal sódica de novobiocina, 10 mg/l de oxalato verde malaquita y 40 mg/l de yoduro potásico). El caldo KIMAN puede ser considerado una buena alternativa para el caldo SC, ya que ambos se utilizan a 37°C, y el caldo KIMAN es menos tóxico para el medio ambiente y más eficiente que el SC. De todas formas una combinación de caldo RV y caldo KIMAN puede ser recomendado para la máxima recuperación de *Salmonella* a partir de los productos del pollo (Blivet y col., 1997).

El aislamiento y la identificación de *Salmonella* se realizan a través de cultivos sólidos selectivos en placas de Petri. Los agentes selectivos más comúnmente utilizados en estos medios de cultivo son las sales biliares, el desoxicolato, el verde brillante, el sulfito de bismuto y los antibióticos (NF ISO 6579, 1993)

La diferenciación de *Salmonella* de otros microorganismos se consigue a través de los cambios de color con indicadores de pH, presentes en los medios de cultivo, al responder a las fermentaciones de la lactosa o la sacarosa, dependiendo todo ello de la producción de SH_2 o de la descarboxilación de la lisina. Normalmente, los medios de cultivo sólidos selectivos más utilizados son el verde brillante con o sin sulfadiacina o sulfapiridina, el desoxicolato de lisina xilosa, el sulfito de bismuto, el agar entérico Hektoen, el agar MacConkey, el desoxicolato citrato y el agar Salmonella-Shigella (ICMSF, 1996).

El aislamiento de *Salmonella* se realiza principalmente mediante dos medios de cultivo sólidos específicos: el agar TSI (agar triple azúcar hierro) y el agar LIA (agar lisina hierro). Una vez aislada la bacteria con estos medios de cultivo, la caracterización se completa con un test bioquímico completo.

El último paso en la identificación de la *Salmonella* es el test serológico. Este se basa en la capacidad de aglutinación de la bacteria frente a determinados antisueros específicos de los antígenos somático (O), flagelar (H) y capsular (Vi).

Y es en este último paso donde encontramos un método serológico rápido y eficaz; donde se detectan antígenos somático (O) con serotipos de los grupos A-E. Siendo estos serotipos los de mayor incidencia en las toxiinfecciones alimentarias.

La forma de interacción con esta prueba serológica REVEAL 2.0 SALMONELLA y la muestra, se evidencia con coloraciones en láminas de nitrocelulosa. . La ventaja de la nitrocelulosa es un material inerte que no reacciona.

En la cual hay una línea de reacción producida por la interacción de las partículas de Oro con un inactivador específico para estas partículas de Oro. Produciéndose una zona de reacción. Originando una línea de control.

Mientras que para poder evidenciar la línea de positividad, se debe formar un complejo, con el antígeno y el anticuerpo

específico para *Salmonella*, junto con las partículas de oro. Este complejo viaja por una lámina de nitrocelulosa. Donde se encuentra con un inactivador específico del anticuerpo para *Salmonella*. Formando un complejo inocuo. Donde se encuentra conformado solo por las partículas de oro y el antígeno de *Salmonella*. Este complejo es el responsable de la coloración, logrando a su vez la línea que refleja el positivo de la prueba.

1.6 Características ecológicas y epidemiológicas

1.6.1 Listeria

El género *Listeria* tiene un amplio espectro de distribución ambiental, siendo aislado en una gran variedad de hábitats, como aguas residuales, barros de aguas residuales, agua, tierra, ensilados, vegetales, carnes crudas y heces de animales y personas sanas. Podríamos decir, por lo tanto, que es ubicua en la naturaleza.

Las diferentes especies de *Listeria*, incluida *L. monocytogenes*, se pueden aislar regularmente del suelo y

de las plantas, dando un resultado positivo a la identificación de *L. monocytogenes* que puede variar desde el 9% hasta el 44% (Weis y Seeliger, 1975; Skovgaard y Morgen, 1988).

Las muestras fecales de terneros están contaminadas en un 68% con *Listeria* spp., y un 52% con *L. monocytogenes*. En las muestras fecales de pollo un 33% contienen *Listeria* spp. y otro 33% contiene *L. monocytogenes* (Skovgaard y Morgen, 1988).

El alto porcentaje de muestras positivas a *Listeria* en piensos se corresponde con un alto porcentaje de muestras positivas en las heces de ternera. El 82% de las muestras analizadas de pienso contenían *Listeria* spp. y el 62% *L. monocytogenes*. El aislamiento de las diferentes especies de *Listeria* en piensos varía desde un 67% hasta un 100%. *L. monocytogenes* fue aislada a partir de los ensilados y de la paja con pH alcalinos en un 62% y un 67%,

respectivamente (Skovgaard y Morgen, 1988; Cox y col., 1989).

La contaminación de los vegetales con *L. monocytogenes* se produce en el campo. El almacenamiento prolongado en frío de los vegetales y la ausencia de cocinado de los mismos hace que la ingestión de estos productos contaminados produzca una colonización del tracto gastrointestinal de las personas más susceptibles. La práctica habitual de conservar en frío durante cierto tiempo a los vegetales después de su distribución por los mayoristas, puede permitir que un inoculo inicial pequeño de *L. monocytogenes* proliferare, o bien que el frío cause la muerte de los microorganismos competitivos favoreciendo su crecimiento (Schlech y col., 1982). La incidencia de *L. monocytogenes* en productos vegetales congelados es de un 2,2% y la de *Listeria spp.*, es de un 20% (Aguado y col., 1997)

En el caso de la leche, la contaminación se produce durante el ordeño (Skovgaard y Morgen, 1988; Cox y col., 1989). Los brotes epidémicos ocasionados por *L. monocytogenes* se han asociado al consumo de productos lácteos como quesos curados tradicionales, quesos blandos, quesos de tipo Cheddar y en quesos de tipo Camembert (Rijpens y col., 1997).

Skovgaard y Morgen (1988) detectaron que un 67% de las muestras de carne picada de vacuno estaban contaminadas con *Listeria spp.*, y que un 28% de ellas con *L. monocytogenes*. Las muestras fueron recogidas en carnicerías y supermercados de Copenhage (Dinamarca) a través de los controles rutinarios que ejerce la administración danesa.

Aguado y col. (1997) encontraron una incidencia del 5,5% de *L. monocytogenes* y del 25,9% de *Listeria spp.* en productos cárnicos cocidos en lonchas envasados

comercialmente y adquiridos en supermercados durante 1996.

Diversos autores indican que la carne de ave presenta entre un 47 y un 60% de muestras positivas a la identificación de *Listeria spp.* En la piel del cuello del pollo un 94% fueron positivas y de ellas un 47% eran *L. monocytogenes* (Skovgaard y Morgen, 1988; Franco y col., 1995; Rijpens y col., 1997; Uyttendaele y col., 1997).

Uyttendaele y col. (1997) realizó un estudio en mataderos de aves de Bélgica y Francia sobre la presencia de *L. monocytogenes* en las canales de pollo. Encontró una incidencia del 32,1% en 1992 y del 27,2% en 1993. En 1994 se redujo hasta un 12,8% y en 1995 a un 9,5%.

La incidencia de *Listeria spp.* en los quesos frescos es del 26,3%. La prevalencia de *Listeria spp.* en tres puntos distintos del proceso de elaboración del queso (inmediatamente después del cuajo, después del moldeado

y prensado) fue de un 4,4%, 13,3% y 23,3%, respectivamente (Rijpens y col., 1997).

La prevalencia de *Listeria spp.* en las manos y los guantes de los manipuladores de alimentos derivados de quesos tras las fases del moldeado, en el proceso de desuerado de la cuajada y en el prensado de las piezas fue del 16,7%, 33,3% y 40,0%, respectivamente (Genigeorgis y col., 1990).

Las piezas de quesos se contaminan con *Listeria* mayoritariamente a través de las superficies, de los utensilios, del equipo de procesado y debido a la contaminación cruzada. *L. monocytogenes* se ha aislado en el 50% de las piezas de quesos preparadas para consumir antes de ser envasadas (Hudson y Mead, 1989; ICMSF, 1998).

Este microorganismo también se puede encontrar en las superficies húmedas de las plantas procesadoras de alimentos que constituyen los reservorios de *Listeria*, lo que combinado con la habilidad de esta bacteria para crecer a temperaturas bajas, da lugar a una elevada presencia de

Listeria en los refrigeradores y en las unidades de frío. Las superficies de los utensilios y los equipos en contacto con el producto en las fases finales del proceso de carnización tienen una gran importancia como fuentes de contaminación por *Listeria* durante todo el proceso de transformación de los productos (Franco y col., 1995; Chasseignaux y col., 2001). En las industrias alimentarias la *Listeria* se encuentra de mayor a menor frecuencia en zonas húmedas, suelos, lavamanos, residuos alimentarios y superficies de contacto con los alimentos. Estos resultados demuestran que las condiciones de sequedad y la restricción de residuos alimentarios contribuyen al control de estos microorganismos (Cox y col., 1989).

L. monocytogenes sobrevive bien en gran variedad de ambientes y en particular en aquellos que son húmedos y con material orgánico deteriorado. Esto, junto con la tolerancia a los agentes conservantes más comunes, tales como el CINA y el nitrito, y la habilidad de crecer en una amplia gama de alimentos a temperaturas de refrigeración, hace de *L. monocytogenes* un potente microorganismo

contaminante durante el procesado de los alimentos (McLauchlin, 1994; Cox y col., 1989). Los brotes epidémicos de listeriosis incluyen tanto a productos curados como a quesos, sugiriendo que este microorganismo es capaz de crecer en concentraciones elevadas de NaCl. *L. monocytogenes* es capaz de crecer en medios con un 10% (p/p) de ClNa y sobrevivir durante un año en soluciones que contengan un 16% (p/p) de NaCl (Seeliger, 1961; Nolan y col., 1992).

El 12% de los manipuladores son portadores de *Listeria spp.*, y el 7% son portadores de *L. monocytogenes* (Kerr y col., 1993). Las manos de los manipuladores de alimentos tienen un importante papel en la contaminación cruzada de los mismos. La ausencia de *Listeria spp.* en las manos de los trabajadores de los mataderos debe considerarse como un hecho inesperado. La presencia de *Listeria spp.* en los alimentos se debe a las manipulaciones realizadas por los manipuladores de alimentos. Se observó que el 30% de los trabajadores que estaban en plantas de elaboración de

quesos eran portadores de *Listeria spp.* en sus manos o guantes, y que el 26,7% de las muestras tomadas de los moldes y tapas del prensado de piezas de quesos estaban contaminadas con *Listeria spp.* (Genigeorgis y col., 1990; Kerr y col., 1993).

Cuando el nivel de microorganismos es bajo (< 20 ufc/cm²) las bacterias se eliminan con el lavado de las manos, pero cuando hay un gran número de bacterias este lavado no es eficaz. Las técnicas deficientes de limpieza y de secado de las manos son las responsables de que *Listeria* se encuentre en aquellos individuos cuyas manos pueden estar libres de *Listeria spp.* tras un lavado adecuado. Por lo tanto, son importantes las buenas prácticas de limpieza para los manipuladores de alimentos, y en particular de aquellos que trabajen en establecimientos donde haya carne cruda y lácteos, ya que son fuentes potenciales de *L. monocytogenes* (Kerr y col., 1993; McLauchlin, 1994).

Un amplio número de alimentos se ha asociado a la transmisión de esta infección. Queso blando, leche

pasteurizada, helados, pescado, pescados ahumados, mariscos, carne de pollo cocida, carne de pollo cruda, Frankfurt de pavo, salchichas de cerdo y arroz, paté, fiambre de lengua de cerdo, tabletas de alfalfa, setas salteadas, ensalada de col, vegetales crudos, etc. Aunque estos alimentos sean muy diversos, la mayoría de ellos tienen en común un alto grado de procesamiento, con aumentos relativos de la vida comercial del producto o de períodos de maduración que permiten el crecimiento de *L. monocytogenes* (McLauchlin, 1994). Aunque *Listeria spp.* no es patógena para los humanos, su presencia en los alimentos puede considerarse como un indicador de las condiciones sanitarias de los mismos, ya que algunas especies de *Listeria*, especialmente *L. innocua*, pueden enmascarar la presencia de *L. monocytogenes* debido a la competencia nutritiva para su crecimiento (Rijpens y col., 1997).

En los brotes epidémicos o esporádicos de listeriosis con frecuencia es difícil detectar el modo de contaminación de los productos alimenticios implicados. La contaminación y la

supervivencia de *L. monocytogenes* en los alimentos crudos durante el proceso de producción es debido a la tolerancia de la bacteria a las condiciones adversas incluyendo la temperatura, el pH extremo y la presencia de conservantes alimentarios (Kerr y col., 1993).

En la Tabla 3 se reflejan las principales toxiinfecciones alimentarias relacionadas con el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* ocurridos en el mundo a partir de 1981.

TABLA 3.
PRINCIPALES TOXIINFECCIONES ALIMENTARIAS
PRODUCIDAS POR *L. MONOCYTOGENES* EN EL MUNDO A
PARTIR DE 1981

País	Año	Nº Casos	Serovar	Alimento Implicado
CANADA	1981	41	4b	Ensalada
USA	1983	43	4b	Leche
USA	1985	142	4b	Queso

SUIZA	1983-1987	122	4b	Queso
REINO UNIDO	1987-1989	300	4b	Paté
FRANCIA	1992	279	4b	Lengua en Gelatina
FRANCIA	1993	307	4b	Rillettes
USA	1998	20	4b	Hot dog
USA	2000	29	4b	Carne de Pavo
USA	2000	12	4b	Queso fresco

Fuentes: World Journal of microbiology and Biotechnology

Las principales vías de transmisión de *Listeria* son el contacto directo del hombre con el animal infectado, la infección cruzada durante el periodo neonatal, y la transmisión alimentaria. El periodo de incubación (en la mayoría de los casos es corto): 1 ó 2 días en las lesiones cutáneas, de 5 a 12 días en las infecciones neonatales, y 1 día en los casos de infección alimentaria asociada al consumo de queso blando. Se ha demostrado que en la infección alimentaria el periodo de incubación en algunos individuos es relativamente largo, cercano a los 90 días. No

se sabe el porqué de estas diferencias en el período de incubación, pero en el caso de la ingestión oral depende del número de células o de la cepa. La dosis infectiva en las epidemias de listeriosis es alta, superior a 10³ ufc/g, y puede variar en función de los individuos y de su estado inmunológico. *L. monocytogenes* se ha extendido por todo el medio ambiente, incluso en los alimentos, aunque esté presente generalmente en un número bajo. Esto, junto con las propiedades de los alimentos y a la transmisión de la infección, nos demuestra que la dosis infectiva necesaria en la transmisión a través de los alimentos es alta (McLauchlin, 1994).

Según Duggan y Phillips (1998), el grado de contaminación y la incidencia de *Listeria* varían según el tipo de alimento. En general, las carnes frescas presentan cantidades < 100 ufc/g, mientras que las carnes procesadas y los productos derivados de las aves presentan concentraciones mayores. Los alimentos de alto riesgo son frecuentemente productos con muchas manipulaciones, preparados para comer

directamente, almacenados en refrigeración durante largos períodos de tiempo y contaminados con gran número de *L. monocytogenes* (>100 ufc/g ó ml). Diversos estudios epidemiológicos indican que las dosis de las infecciones humanas están entre 10⁶ ufc/g (Juntilla y Brander, 1989; Duggan y Phillips, 1998) y 10⁹ ufc/g (Azadian y col., 1989; Duggan y Phillips, 1998), aunque para las personas inmunodeprimidas la dosis infectiva es más baja (Barnes y col., 1989; Duggan y Phillips, 1998).

El número de células de *Listeria* presente en los alimentos es bajo en la mayoría de los casos. El principal problema es la multiplicación de *Listeria spp.* durante el almacenamiento, incluso a bajas temperaturas como las de refrigeración (Hof y Rocourt, 1992). El número de *L. monocytogenes* en el queso blando almacenado a 4°C en el laboratorio se dobla cada 30 a 50 horas (McLauchlin, 1994).

La mayoría de las cepas de *Listeria spp.* tienen una capacidad de ataque baja, aunque algunas cepas de *L.*

monocytogenes pueden tener una gran virulencia (McLauchlin, 1994). Hay varios niveles de virulencia en las cepas de *Listeria* spp. de acuerdo con el serovar que se trate. Así pues, la cepa de *L. monocytogenes* serovar 4b se ha descrito en el 40-44% de los casos esporádicos de listeriosis en humanos en Suecia y E.E.U.U. en 1989 (Roucourt, 1991; Hof, 1984; Knorz y Hof, 1986; Pine y col., 1991; Hof y Rocourt, 1992). Las dos cepas de *L. monocytogenes*, serovar 4bx y 4b fago tipo 6,7, son los principales responsables de la listeriosis humana en el Reino Unido, representando un 30-54% anual de todos los casos registrados (McLauchlin, 1994). La virulencia de la cepa puede variar de acuerdo con las condiciones de crecimiento (Wirsing y col., 1983; Hof y Rocourt, 1992).

La listeriosis en el hombre es una enfermedad que ha tenido un incremento gradual en su incidencia desde 1967 a 1986, con un pico entre 1987 y 1989, seguido por una disminución hasta llegar a un número similar de casos a los registrados en los principios de los años 80 (ICMSF, 1996). La listeriosis

causada por *L. monocytogenes* y vehiculada por los alimentos se ha reconocido durante la última década como una toxiinfección alimentaria emergente. El número de brotes de listeriosis es bajo en comparación con los alimentos contaminados con *Salmonella* o con *Campylobacter* patógenos que dan lugar a mortalidades más altas (10-30%) (Farber y Peterkin 1991; Uyttendaele y col., 1997).

La incidencia de la listeriosis en humanos en el Reino Unido es de 2 a 3 casos por millón de personas (McLauchlin, 1994). Entre 1983 y 1996, en el Reino Unido, el nivel de listeriosis se mantuvo entre 1,6 y 2,7 por millón de personas, lo que significa que la infección afectó a las personas comprometidas inmunológicamente ya que el número de casos asociados a la gestación disminuyó desde un 31% en 1983 hasta un 26% en 1996. La incidencia de infecciones de *L. monocytogenes* en el Reino Unido es baja (116 casos en 1996) si lo comparamos con los casos de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* (29.887 y 43.877,

respectivamente), pero el índice de mortalidad es de aproximadamente un 30% en los casos asociados al embarazo (Duggan y Phillips, 1998).

En EEUU la incidencia de listeriosis en adultos es de 5 casos por millón. La incidencia de listeriosis perinatal varía desde 78 casos por millón a 243 casos por millón de nacimientos vivos. En 1985 se estimaba que la incidencia mínima de la listeriosis en adultos era de 0 a 3 casos por cada 100.000 personas del total de la población, y un caso de listeriosis perinatal por cada 20.000 nacimientos. El índice de mortalidad de la listeriosis adulta es del 25% en edades inferiores a 60 años, y del 41% en adultos de más de 60 años (ICMSF, 1996).

La listeriosis humana más frecuente afecta a las mujeres embarazadas, neonatos y pacientes inmunodeprimidos, afectando al sistema nervioso central y distribuyéndose a través del torrente sanguíneo. En las mujeres no embarazadas y en los individuos sanos puede cursar de

forma subclínica o bien, con más frecuencia, con meningitis o septicemia, mientras que en los animales se presenta con encefalitis o septicemia (McLauchlin, 1994).

La *L. monocytogenes* puede ser detectada en las heces de una parte de la población humana sana, así como en los animales sanos en los que puede aparecer como parte de la flora intestinal normal (ICMSF, 1996).

Un tercio de las infecciones de *L. monocytogenes* en el hombre son perinatales, incluyendo a la mujer embarazada (ya que ésta tiene una cierta alteración de su estado inmunitario que favorece e incrementa su susceptibilidad) y al niño no nato o neonato.

Los síntomas de la infección en los casos perinatales cursan generalmente con fiebre suave en la madre, con o sin gastroenteritis débil, o con síntomas de gripe; pero las consecuencias para el feto o el neonato son mucho mayores e incluso fatales. El feto presenta una infección septicémica generalizada que provoca, en la mayoría de los

casos, la muerte intrauterina durante el primer trimestre del embarazo. En infecciones posteriores puede que el niño nazca prematuramente y seriamente enfermo. La septicemia es lo más común en estos casos y, a veces, va acompañada de meningitis. En listeriosis tardías, alrededor de los diez días después del nacimiento, normalmente cursa con meningitis (ICMSF, 1996).

Los dos tercios restantes de infecciones afectan al resto de la población adulta. En este caso, la mayoría de las infecciones causadas por *L. monocytogenes* afecta a la población cuya inmunidad está deteriorada, tales como personas que padecen cáncer, procesos postoperatorios de trasplante de órganos, procesos con tratamiento de cortico esteroides, o enfermos de SIDA (Uyttendaele y col., 1997). Estos pacientes sufren una bacteriemia y, en un tercio de los casos, una meningitis asociada o no a la bacteriemia. Un pequeño porcentaje presenta lesiones locales incluyendo endo oftalmitis, artritis séptica, osteomielitis, pericarditis y endocarditis sin síntomas de bacteriemia (ICMSF, 1996).

1.6.2 Salmonella

Salmonella se encuentra distribuida por todo el mundo y es universalmente reconocida como un agente zoonótico. Se han identificado numerosos reservorios animales, y muchos alimentos particularmente los de origen animal, han sido identificados como vehículos transmisores de este patógeno a los humanos y de la extensión a todos los procesos y manipulaciones que se realizan en las plantas industriales y en los hogares.

La distribución ubicua de *Salmonella* en el medio ambiente, su prevalencia en la cadena alimentaria global, su adaptabilidad fisiológica para cambiar según el ambiente, su resistencia a las condiciones adversas, su virulencia, la impredecible patogenicidad de sus cepas invasivas, la prevalencia de los biotipos resistentes a antibióticos, el continuo incremento global de los casos de salmonelosis humana y su impacto económico en la industria alimentaria, hacen necesaria la continuidad de la vigilancia y el control

estricto, a todos los niveles, de la producción de alimentos. El importante crecimiento del comercio internacional de alimentos entre países que tienen diferentes niveles de higiene en su industria agroalimentaria y en sus procesos agrícolas produce un problema de salud pública de elevada complejidad. La ubicuidad de esta bacteria asegura la preeminencia de este patógeno en la cadena alimentaria global y su importancia como agente causante de toxiinfecciones alimentarias (D'Aoust, 1994; ICMSF, 1998).

La contaminación del medio ambiente con *Salmonella* es debido exclusivamente a la transmisión de la bacteria a través de las heces contaminadas, ya sea a través de aguas residuales de animales infectados o bien por las heces infectadas que puedan contaminar las aguas. Las aguas residuales pueden contener gran número de *Salmonella* y si estas aguas se utilizan con fines agrícolas se puede diseminar con gran facilidad. Cuando *Salmonella* se introduce en un hábitat puede permanecer viable durante muchos meses (ICMSF, 1996, 1998).

La *Salmonella* vive en el tracto intestinal de los animales infectados incluido el hombre y se excreta a través de las heces, pudiendo permanecer viable en el material fecal durante años fuera del huésped y transmitirse a los humanos a través del contacto de las manos con los animales o con todo aquello que haya sido contaminado por las heces, ya sea la paja de los lechos de los animales, la comida, las patas, el suelo e incluso su piel. La comida, los piensos y el agua son los vehículos primarios. La contaminación por *Salmonella* puede extenderse a todo un rebaño de animales durante el transporte al matadero, o bien en las cuadras del mismo durante el período de descanso de los animales antes del sacrificio (ICMSF, 1996). La carne, la carne de ave de corral, los productos lácteos, el contagio persona-persona y el contagio animal doméstico-persona son algunas de las principales causas de los brotes epidémicos producidos por *Salmonella* (Khakhria y col., 1997).

Los alimentos de origen animal se contaminan a través de los equipos sucios con material fecal y por ambientes contaminados de los mataderos. La contaminación cruzada se produce por el contacto de los alimentos crudos durante todo su proceso de elaboración con alimentos o utensilios contaminados con *Salmonella*, pudiendo ésta permanecer y multiplicarse en los equipos y en el ambiente de cualquier proceso de manipulación y/o procesado de alimentos (ICMSF, 1996, 1998).

En raras ocasiones *Salmonella* está presente en las carnes que provienen de animales enfermos con cuadros clínicos de septicemia, pero sí que se encuentra en la superficie de las carnes que han estado en contacto con contenidos intestinales infectados, debido a malas manipulaciones durante el proceso de sacrificio en los mataderos. Las contaminaciones entre las canales generalmente son debidas a la entrada en contacto de la carne con utensilios o superficies contaminadas (Brewer y col., 1995; ICMSF, 1996).

Los productos de origen aviar, tanto sus derivados cárnicos como los huevos, son los principales vehículos de transmisión de *Salmonella* a los humanos (Carramiñana y col., 1997; Khakhria y col., 1997). Los cambios en los hábitos alimenticios, los catering a gran escala, y el incremento del comercio mundial de alimentos y de ingredientes de alimentos han contribuido en gran manera a que se observe un incremento significativo de los brotes epidémicos, siendo la salmonelosis la enfermedad líder en brotes de toxiinfecciones alimentarias en Europa y en E.E.U.U.(ICMSF, 1996).

Las infecciones producidas por *S. hadar* en humanos están normalmente relacionadas con el consumo de pollos y pavos. Entre 1973 y 1974, *S. hadar* se expandió por los corrales de la mayoría de los criaderos de pavos del Reino Unido y se extendió a través de los centros de cría de todo el país. Esta expansión fue acompañada por un rápido incremento de la prevalencia de la bacteria entre la

población humana. La exportación de pavos de cría del Reino Unido hacia Canadá y E.E.U.U. hizo que se incrementara rápidamente el aislamiento de *S. hadar* entre los humanos estando asociado al consumo de pavos y pollos en ambos países. En 1990, *S. hadar* se aisló del 33% de los corrales de pollos, siendo el serovar más común, y en los corrales de pavos es la segunda bacteria aislada (Khakhria y col., 1997).

Las cepas de *S. enteritidis* se aíslan en los corrales de pavos y de otras aves de corral. *S. tiphymurium* es el serovar más comúnmente aislado en terneros y en cerdos. Durante los últimos cinco años ha habido una disminución del número de aislamientos de *S. tiphymurium* en humanos (< 25-30% de los casos descritos en Canadá) que puede deberse a la disminución del consumo de carne de ternera y cerdo, y al incremento del consumo de carnes de ave de corral (Khakhria y col., 1997).

Durante el período de 1983 a 1992 en Canadá, los serovares de *Salmonella* más comúnmente aislados en humanos fueron *S. tiphymurium* y *S. hadar*. El tercer y el cuarto serotipos más comunes fueron *S. enteritidis* y *S. heidelberg* (Khakhria y col., 1997). Desde 1989 hasta 1994 en España, *S. enteritidis* ha estado implicada en el 80% de las toxiinfecciones descritas y provocadas por este microorganismo (Carramiñana y col., 1997).

S. pullorum y *S. gallinarum* son las principales responsables de síndromes gastroentéricos con una elevada mortalidad en los pollos y en las gallinas, siendo estas bacterias altamente específicas a la especie, por lo que su patogenicidad para los humanos es muy baja. Durante las últimas décadas, ciertos fagotipos de *S. enteritidis* han provocado graves problemas en la cría de pollos, en la cría de polluelos y en la producción de huevos, debidos a una transmisión ovárica. Las infecciones humanas debidas a estos fagotipos se han incrementado en muchos países en los últimos años. Así, los pollos, los pavos, las ocas y los

patos son el reservorio animal más importante de *Salmonella spp.* (ICMSF, 1996).

Las canales de pavo y de pollos están frecuentemente contaminadas por *Salmonella* que llega a la canal del animal a través del contenido del tracto intestinal o del material fecal retenido en las patas o en las plumas. Un 30% del material fecal del interior del animal, un 60% de las canales de pollo refrigeradas, y un 80% de los hígados refrigerados están contaminados por algún tipo de bacteria del género *Salmonella spp.* (Carramiñana y col., 1997).

Los serotipos de *Salmonella* aislados en las heces de los animales vivos se encuentran en las canales de pollo y en los hígados. Todo ello nos indica que hay una contaminación cruzada entre las canales de pollo y la microflora endógena de las heces de las aves. Las contaminaciones cruzadas son un gran problema debido a las características del sacrificio de estos animales, siendo críticos los siguientes pasos: el desplumado, la evisceración

y el enfriamiento. La contaminación cruzada provocada por las manos de los manipuladores, por el equipo y por los utensilios utilizados durante el sacrificio pueden extender la bacteria hasta las canales o los trozos de canales sin infectar (Carramiñana y col., 1997; ICMSF, 1998).

La incidencia de *Salmonella* en canales de pollo puede variar desde un 56,7% en el inicio del proceso de carnización, hasta llegar a un máximo del 70% al final del proceso (Carramiñana, 1997).

Las frutas frescas son vehículos de transmisión de *Salmonella* con una incidencia entre un 5,4% y un 11%. Las especias también son un reservorio de *Salmonella spp.* Datos de la última década indican que la prevalencia de *Salmonella* en la pimienta importada de Brasil y de otros países asiáticos tiene niveles de contaminación de un 6,7% a un 13,8%. Estas son frecuentemente utilizadas en la preparación de alimentos donde su adición puede ser peligrosa para la salud (D'Aoust, 1994).

Los productos lácteos también figuran en un puesto importante como agentes transmisores de *Salmonella*. En los últimos años se han descrito muchos episodios de salmonelosis humana debido al consumo de queso contaminado. El queso tipo Cheddar ha sido el responsable de las dos mayores toxiinfecciones en E.E.U.U. (1976) y Canadá (1984), donde *S. heidelberg* y *S. typhimurium* fueron las responsables de 339 casos en E.E.U.U. y 2700 casos en Canadá (Fontaine y col., 1980; D'Aoust, 1994). En Suiza y en el Reino Unido se identificaron como causantes de toxiinfecciones alimentarias por *Salmonella* dos quesos tiernos elaborados con leche cruda no pasteurizada (Sadik y col., 1986; Maguire, 1993; D'Aoust, 1994). Una toxiinfección masiva en varios estados de E.E.U.U. fue causada por *S. enteritidis*, en los que contaminó helados producidos durante el verano de 1994. Esta toxiinfección afectó aproximadamente a 224.000 personas con una tasa de afectados del 6,6% (Hennessy y col., 1996; Vought y Tatini, 1998).

Algunos serovares, como *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi C*, y *S. sendai*, son específicos del hombre y normalmente cursan con un síndrome de septicemia tifoidal. Otros serovares causan síndromes gastroentéricos provocados por la ingestión de alimentos contaminados. Las infecciones por *Salmonella* pueden cursar con tres cuadros clínicos: una gastroenteritis, una fiebre entérica, o una bacteriemia o septicemia (ICMSF, 1996).

El primer cuadro clínico es la gastroenteritis, la cual tiene un período de incubación que puede variar desde las 5 horas a los 5 días. Normalmente la sintomatología aparece a las 12-36 horas posteriores a la ingestión de los alimentos contaminados. Los principales síntomas incluyen diarrea, náuseas, dolor abdominal, fiebres leves y escalofríos. La diarrea puede ser copiosa y se acompaña de una deshidratación severa. También puede cursar, en algunas ocasiones, con vómitos, postración, anorexia, dolor de cabeza, y malestar general. Generalmente la sintomatología desaparece en 2-5 días.

El segundo cuadro clínico es la fiebre entérica, la cual tiene un periodo de incubación que puede variar desde 7 hasta 28 días, dependiendo de la dosis inicial de bacteria ingerida. Como media generalmente es de 14 días. Cursa con malestar general, dolor de cabeza, fiebre alta persistente, dolor abdominal, dolor general del cuerpo y debilidad con constipación. También puede cursar con náuseas, vómitos persistentes, escalofríos y anorexia. También, se han observado bradicardias, distensión abdominal y esplenomegalia. El periodo de convalecencia es largo y lento, de 1 a 8 semanas.

El tercer cuadro clínico es la bacteriemia o septicemia, provocada por la presencia de *Salmonella* en la sangre. La sintomatología cursa con una fiebre alta y persistente, dolor en la espalda, en el abdomen y en el pecho, escalofríos, transpiración, malestar, anorexia y pérdida de peso. No son comunes pero se han descrito secuelas como apendicitis, artritis, colecistitis, endocarditis, abscesos locales, meningitis, osteomielitis, osteoartritis, pericarditis, peritonitis,

neumonías e infecciones del tracto urinario (Archer y Young, 1988; ICMSF, 1996).

En el año 1963, hubo cerca de 20.000 casos de salmonelosis en E.E.U.U.; esta cifra ha ido aumentando cada año hasta los 48.000 casos anuales descritos en el año 1988. Se estima que, en la actualidad, pueden llegar a 4,8 millones de casos al año (ICMSF, 1996). Durante el periodo de 1983 a 1992 se diagnosticó *Salmonella* en un total de 89.760 humanos y 22.551 animales en Canadá (Khakhria y col., 1997). Los valores de incidencia de *Salmonella spp.* en la última década han variado de 17,4 casos a 187 casos por cada 100.000 personas (D'Aoust, 1994).

Se han descrito que los brotes epidémicos de salmonelosis en los países industrializados tienen una variación estacional a lo largo del año. Así, el pico de brotes se produce durante los meses que hace más calor, en verano. El 40% de los casos de salmonelosis se dan en niños de edades inferiores a los 5 años y el resto en adultos de más

de 60 años que padecen enfermedades crónicas, y, en general, en todos aquellos individuos que tienen reducida su respuesta inmunitaria. Estudios demográficos sobre el impacto socioeconómico de las enfermedades demuestran que hay altos índices de salmonelosis en clases sociales económicamente bajas y en áreas de elevada densidad de población (ICMSF, 1996).

El costo de las toxiinfecciones alimentarias producidas por *Salmonella* se ha calculado a partir de los costes directos e indirectos que ha producido la infección. Como costes directos se entiende la investigación epidemiológica, el diagnóstico de laboratorio, el tratamiento de los enfermos, las pérdidas económicas por publicidad negativa del responsable de la toxiinfección, la eliminación de los productos sospechosos y los costes legales que se deriven. Como costos indirectos se entienden las compensaciones económicas a los afectados por el dolor, sufrimiento o por pérdida de vidas humanas (ICMSF, 1996).

La dosis infectiva (ID₅₀) para las personas sanas se encuentra entre 10⁷ y 10⁹ células pero ello depende de diferentes factores. Por ejemplo, en una toxiinfección provocada por un helado contaminado con un número pequeño de *S. enteritidis* pero distribuida homogéneamente en el producto la dosis infectiva causante de la enfermedad sintomática fue sólo de 25 células (Gerba y col., 1996; Vought y Tatini, 1998). En el caso de los individuos susceptibles se puede provocar la enfermedad con sólo 10 bacterias de la cepa apropiada de *Salmonella* (Carramiñana y col., 1997). En alimentos ricos en grasas y/o azúcares la dosis infectiva puede ser de 10⁴ a 10⁵ células (D'Aoust y col., 1975; Fontaine y col., 1980; Greenwood, 1983; D'Aoust 1985; Vought y Tatini, 1998).

Los factores que afectan a la dosis infectiva pueden ser los siguientes: la supervivencia de la bacteria en su paso por el estómago y a la acción de los ácidos gástricos, la virulencia de la cepa de *Salmonella*, la tolerancia o susceptibilidad

individual de la persona afectada y su estado inmunológico, y el estado de salud del individuo y su edad (ICMSF, 1996).

Se ha sugerido que la dosis infectiva de *Salmonella* puede estar influenciada por la composición de los alimentos ingeridos y por el tiempo de exposición al microorganismo infectivo. Por ejemplo, los alimentos con un alto contenido en grasa pueden proteger la *Salmonella* contra la acción de las secreciones gástricas debido al encapsulamiento del patógeno en la micela de lípido, facilitando el paso de la bacteria por el estómago hasta el intestino sin ser dañada y facilitar su multiplicación e invadir el intestino y, a partir de aquí, diseminarse por los tejidos (D'Aoust, 1994). La elevada cantidad de grasas y/o azúcares en los productos alimenticios protegen a la bacteria de las barreras gástricas naturales y permiten que la bacteria llegue al intestino donde producirá la enfermedad sintomática (Vought y Tatini, 1998).

1.7. Características de resistencia, control y prevención

1.7.1 Listeria

▪ Temperatura

La temperatura óptima para el crecimiento de las bacterias del género *Listeria* está entre 30°C y 37°C, aunque los límites de temperatura en los cuales puede crecer o sobrevivir van desde 0,4°C a 45°C. Así, esta bacteria no sobrevive a temperaturas de 60°C durante 30 minutos, pero puede sobrevivir durante bastantes semanas a -18°C en diferentes substratos alimentarios (Golden y col., 1988; Olsen y col., 1988; ICMSF, 1996).

El estudio del crecimiento de tres cepas distintas de *L. monocytogenes* a temperaturas de refrigeración desde -0,5°C hasta 9,3°C en pollos y/o leche UHT, dio como resultado que tras 1 a 3 días a 5°C la concentración bacteriana aumentó un ciclo logarítmico. De igual forma, a 0°C este aumento se produjo entre 3 y 34 días. Los tiempos de generación que se registraron fueron de 13-24 horas a 5°C, y de 62-131 horas a 0°C. Las temperaturas más bajas que permitieron el crecimiento de *L.*

monocytogenes en pollo fueron de $-0,1^{\circ}\text{C}$, $-0,4^{\circ}\text{C}$ y $-0,2^{\circ}\text{C}$. El intervalo de temperatura mínimo en el que las cepas de *L. monocytogenes* crecieron fue desde $-0,1^{\circ}\text{C}$ a $-0,4^{\circ}\text{C}$. Estos resultados indican que las temperaturas que se utilizan para refrigerar los alimentos en los establecimientos, de 0°C a 10°C , son incapaces de prevenir el crecimiento de estas bacterias (Walker y col., 1990).

La capacidad de *L. monocytogenes* de sobrevivir a la congelación y al almacenamiento a temperaturas inferiores a -18°C en carnes picadas de pavo y, en general, en todas las carnes, depende de la acidez del alimento, es decir, del pH. El daño que producen las bajas temperaturas a la bacteria se da, en la mayoría de los casos, durante las primeras 24 horas de congelación y este daño permanece constante o bien se incrementa durante los 14 días siguientes. El daño producido por las temperaturas de congelación puede ser reversible en todas las cepas de *Listeria* que se han estudiado si se utilizan caldos reparadores para su recuperación, tales como el caldo TSB y/o LRB. Aunque el daño celular hace perder capacidad infectiva a la bacteria, ésta puede recuperar su capacidad de

multiplicación si está sometida a condiciones favorables para su crecimiento (Ray 1979; Flanders y Donnelly, 1994). El pH del alimento es el factor que más influye en la capacidad de *Listeria* para resistir las bajas temperaturas de congelación. Así, valores de pH inferiores a 4,74 hacen que *L. monocytogenes* muestre una disminución en la recuperación de células viables que han sido dañadas por el frío (Palumbo y Williams, 1991; Flanders y Donnelly, 1994).

Los tratamientos por el calor a temperaturas de 70°C durante 2 minutos fueron suficientes para inactivar a *L. monocytogenes* durante la cocción de la carne cruda. Esta resistencia al calor es mayor cuando se trata de productos curados que si se trata de carne cruda, debido, probablemente, a la protección que pueden ejercer las grasas cuando se añaden en los productos curados al incrementar la resistencia al calor (Mackey y col., 1990; Carlier y col., 1996).

En los productos cárnicos curados las fermentaciones que utilizan cultivos estarter que producen bacteriocinas eliminan aproximadamente de 2 a 3,5 log₁₀ ufc/g de *L. monocytogenes*

en salchichas de pavo y de pollo, y si añadimos al proceso un tratamiento térmico, podemos reducir adicionalmente de 4 a 5 unidades log₁₀ ufc/g del patógeno (Baccus-Taylor y col., 1993; Luchansky y col., 1992; Roering y col., 1998).

Existe una gran variabilidad de sensibilidad al calor entre las diferentes cepas de *L. monocytogenes*. Un tratamiento eficaz anti listeria sería aquel que destruyese la máxima cantidad de células de la cepa más termorresistente. Así pues, un tratamiento térmico a 72°C durante 15 segundos en la leche (o bien un tratamiento equivalente) destruye el 99,99% de la población de Listeria (ICMSF, 1996).

L. monocytogenes es aproximadamente cuatro veces más resistente al calor que *Salmonella spp.* en las carnes picadas. Generalmente, es más tolerante al calor en la carne que en la leche o en el huevo. En carnes contaminadas naturalmente es, aproximadamente, de dos a cuatro veces más sensible al calor que en carnes contaminadas experimentalmente. También es más resistente que muchos otros patógenos a los efectos de los ácidos en combinación con el calor. La resistencia térmica de *L.*

monocytogenes en la carne es considerablemente más alta que la de *Salmonella spp.*, sin embargo, la temperatura de destrucción de *Salmonella spp.* es la que se utiliza para establecer el mínimo térmico en los procesos industriales (Schoeni y col., 1991; Mazzotta, y col., 2001).

- **pH**

Los valores de pH en los que el crecimiento de la *Listeria* está favorecido se encuentran entre valores ligeramente alcalinos a neutros. Así, el intervalo óptimo estaría entre pH 6 y 9. Algunas cepas pueden crecer hasta valores de 9,6 pero, normalmente, a pH inferiores a 4,6 todas las cepas de *Listeria* mueren (ICMSF, 1996).

La supervivencia de *Listeria* a pH bajos y con altas concentraciones de sal es altamente dependiente de la temperatura a la que se someta el alimento. El valor mínimo de pH que permite la supervivencia de la bacteria a una concentración inicial de 10^4 ufc/g resultó ser de 4,66 a 30°C (Cole y col., 1990), y tras 4 semanas fue de 4,36 a 10°C y de 4,19 a 5°C. Estos límites están en función de la concentración de sal: bajas concentraciones (de 4% a 6%) aumentan la

supervivencia de la bacteria, y concentraciones superiores al 6% la reducen (Gnanou Besse y col., 2000). La concentración óptima de sal para el crecimiento de *L. monocytogenes* a 10°C estaría alrededor de un 2-2,5% (Cole y col., 1990).

La capacidad de *Listeria* para crecer en pH bajos está influenciada por la naturaleza del acidulante. En medios acidificados con ClH, el pH mínimo para el crecimiento es de 4,39 (George y col., 1988), mientras que en zumo de calabaza acidificado con ácido láctico no se detectó crecimiento hasta un pH de 4,8 (Conner y col., 1986). Los ácidos orgánicos son, generalmente, más inhibidores del microorganismo que los ácidos inorgánicos debido a su naturaleza lipofílica (Corlett y Brown, 1980). La efectividad de los ácidos débiles, como los desinfectantes de las superficies y como los conservantes de los alimentos, contra *L. monocytogenes* está influenciada por el pH (Cole y col., 1990; Oh y Marshall, 1996; Blom y col., 1997).

- **Actividad de agua (aw)**

El límite de los valores de actividad de agua que afectan al crecimiento de las bacterias del género *Listeria* es de, aproximadamente, 0,90 a 30°C cuando se utiliza el glicerol para controlarla (Farber y col., 1992). Las actividades de agua bajas con temperaturas de 4°C aumentan el efecto bacteriostático (Tapia de Daza y col., 1991).

Según Nolan y col. (1992) *L. monocytogenes* es más resistente en condiciones de osmolaridad altas. El crecimiento de *L. monocytogenes* con actividad de agua entre 0,924 y 0,921 es muy reducido, y su tiempo de generación a 0,924 es aproximadamente de 62 minutos. La actividad de agua mínima para el crecimiento de *L. innocua* es ligeramente más alta, entre 0,929 y 0,924. Según parece, *L. innocua* tolera una actividad de agua menor que *L. monocytogenes*. La actividad de agua mínima para que *L. monocytogenes* crezca en un medio ajustado con sucrosa está entre 0,925 y 0,920. Se ha detectado una pequeña diferencia entre la mínima actividad de agua que las dos especies necesitan para crecer cuando se

utiliza el glicerol como humectante: 0,911 en el caso de *L. monocytogenes* y entre 0,904 y 0,897 en el de *L. innocua*.

- **Vacío**

Durante el almacenamiento bajo refrigeración de los productos lácteos envasados al vacío se puede producir el desarrollo de *L. monocytogenes* que aumenta aproximadamente, en una potencia de 10 a 2°C y de 2 a 4 potencias de 10 a 4°C. A 7°C el crecimiento comienza a los 3 días y alcanza en la primera semana de almacenamiento, 100 veces el recuento inicial. Por lo tanto, en el almacenamiento a temperaturas de 6°C a 7°C (temperatura aproximada de un refrigerador domestico) de un producto lácteo envasado al vacío y contaminado con *L. monocytogenes*, cabe esperar que con una carga inicial no superior a 10 ufc/g, la carga microbiana del producto en el momento de ser consumido puede llegar a recuentos de *L. monocytogenes* superiores a 10⁴ ufc/g (Schmidt y Kaya, 1991).

- **Altas presiones**

La principal característica de las altas presiones es la de ser un proceso no térmico capaz de destruir a los microorganismos sin que haya una alteración de las características organolépticas y nutricionales de los alimentos, y de proporcionar salubridad y durabilidad a los mismos. Sin embargo, este proceso tiene algunas desventajas. A altas presiones el proceso puede no ser económico para su uso comercial debido al alto costo de los equipos y al incremento de fatiga de los elementos metálicos de las instalaciones. Además, la textura y el color de algunos alimentos pueden ser alterados y algunas esporas de bacterias pueden ser resistentes a este proceso (Kalchayanand y col., 1998a; Alpas y col., 1999; Garriga y col., 2002).

Estudios realizados por Kalchayanand y col. (1998a, 1998b) y Simpson y Gilmour (1997b) han revelado que:

- (i) La viabilidad de las células disminuye con el incremento de la presión y el tiempo.
- (ii) Por encima de 200 MPa (milipascales), incluso después de 30 minutos, la muerte celular es =1 logaritmo.

(iii) Los datos de mortalidad celular no corresponden a una cinética de primer orden, pero por encima de 275 MPa estos valores tienen una fase inicial exponencial.

(iv) Las bacterias Gram negativas tienen mayor sensibilidad que las bacterias Gram positivas, y en ambos grupos hay diferente sensibilidad a la presión según las especies y/o cepas que se traten.

(v) La viabilidad de este proceso es menor en un alimento que en un tampón de fosfato.

En general, la destrucción celular se incrementa cuando aumenta la presión, el tiempo de presurización y la temperatura. Las bacterias Gram negativas y las células en fase de crecimiento exponencial son, respectivamente, más sensibles que las bacterias Gram positivas y las células en fase estacionaria (Kalchayanand y col., 1998a; Alpas y col., 1999; Garriga y col., 2002). Así, las células desarrollan proporcionalmente una mayor sensibilidad a la presión cuando ésta se incrementa hasta valores superiores a 276 MPa y la

temperatura se incrementa por encima de 35°C (Kalchayanand y col., 1998a).

Hay estudios que demuestran que las células bacterianas son menos sensibles a la presurización entre 20°C y 30°C, pero que a temperatura superior a 35°C empiezan a ser extremadamente sensibles (Carlez y col., 1992; Ludwig y col., 1992; Kalchayanand y col., 1996, 1998b). Una combinación de presión hidrostática moderada (como 345 MPa) y una temperatura de 50°C se pueden utilizar para obtener una disminución de la viabilidad de los patógenos en más de 6 logaritmos. La incorporación de otros parámetros, como la presencia de bacteriocinas durante la presurización puede acentuar esta disminución (Alpas y col., 1999).

El efecto de las altas presiones en los microorganismos depende en primer lugar del daño que se pueda causar en la membrana celular, lo cual provoca un incremento de su permeabilidad y en última instancia, la muerte de la célula (Murano y col., 1999). Cuando se aumenta la presión, los

cambios morfológicos progresivos son más evidentes llegando a la lisis celular que sólo aparece con tratamientos de altas presiones. Una disminución del pH (pH interior – pH exterior), del potasio intracelular, del contenido celular de ATP y de los potenciales de membrana quedan demostrados con el incremento de presión (Tholozan y col., 2000).

Las altas presiones destruyen las estructuras terciarias y secundarias de las macromoléculas, tales como las proteínas y los polisacáridos, alterando su estructura y su integridad funcional (Kalchayanand y col., 1998b). La presurización infringe daños subletales en las bacterias, tanto en las células Gram negativas como en las Gram positivas, lo que las hace susceptibles a los compuestos antibacterianos, tales como las bacteriocinas y las lisozimas (Garriga y col., 2002). Se ha demostrado que a 345 Mpa, a 50°C, durante 5 minutos y con bacteriocinas hay una reducción aproximada de 8 logaritmos en la viabilidad de los patógenos (Kalchayanand y col., 1998b).

Aunque las bacterias y los hongos son destruidos a bajas presiones, para destruir las esporas de las bacterias se necesitan presiones mucho más altas. Presiones altísimas pueden incluso inactivar enzimas de los alimentos y alterar su textura, color y propiedades fisicoquímicas, especialmente sus proteínas y almidón (Hoover y col., 1989; Cheftel, 1992; Hayashi, 1992; Hoover, 1993; Knorr, 1993; Kalchayanand y col., 1998b).

El tratamiento con altas presiones y con calor durante 6 minutos puede reducir hasta 10 log₁₀ la población de la cepa de *L. monocytogenes* más resistente a la presión (Murano y col., 1999). La combinación de 344,7 MPa, 50°C y 9,1 minutos puede reducir la viabilidad de esta bacteria hasta 7 logaritmos (Simpson y Gilmour, 1997a; Alpas y col., 1998).

La población de *L. monocytogenes* en el músculo de cerdo se elimina completamente con presiones superiores a 414 MPa (Murano y col., 1999). El tratamiento de carne picada de cerdo contaminada con *L. monocytogenes* por este proceso,

conjuntamente con temperatura de 50°C durante 6 minutos, puede alargar seis veces la vida comercial de este producto (Murano y col., 1999).

En general, la pérdida de viabilidad de *L. monocytogenes* se incrementa con el aumento de la presión, de la temperatura y del tiempo. Presurizaciones de 137,9 y 206,8 MPa durante 30 minutos a 50°C, reducen las poblaciones bacterianas alrededor de 1 y 2 ciclos logarítmicos respectivamente (Alpas y col., 1998).

La resistencia de *L. innocua*, tomada como modelo en lugar de *L. monocytogenes*, a las altas presiones en huevo entero líquido, se estudió a diferentes presiones (300, 350, 400 y 450 Mpa), a diferentes temperaturas (-15, 2 y 20°C) y a diferentes tiempos (5, 10 y 15 minutos), y no fue totalmente inactivada en ninguno de los tratamientos aplicados. La mayor inactivación se consiguió a 450 Mpa a 20°C durante 15 minutos, con una reducción de 5 ciclos logarítmicos (Ponce y col., 1998).

▪ **Competencias biológicas**

La flora de alteración puede influir en el crecimiento característico de un patógeno en un alimento, debido principalmente a la producción de metabolitos antimicrobianos por parte de la flora competitiva y por la utilización de los mismos nutrientes.

Las bacterias ácido lácticas, micrococos y *Staphylococcus* coagulasa negativos se aíslan habitualmente durante la fermentación de productos cárnicos (Hammes y col.,1990; Bersani y col., 1991; Villani y col., 1994).

Las bacterias ácido lácticas pueden inhibir el crecimiento de los patógenos durante el proceso de fermentación debido a la síntesis de ácidos orgánicos, diacetil, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Klaenhammer 1988; Piard y Desmazeaud 1991; Villani y col., 1994).

Las bacterias del género *Staphylococcus* coagulasa negativas sintetizan una gran variedad de agentes antimicrobianos tales

como enzimas bacteriolíticos, polipéptidos de bajo peso molecular y bacteriocinas que impiden el desarrollo de las bacterias patógenas (Schindler y Schuhardt, 1965; Dajani y Wannamaker, 1969; Gagliano y Hinsdill, 1970; Hsu y Wiseman, 1972; Villani y col., 1994). Así, algunas cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativas son capaces de producir sustancias inhibidoras que son antagonistas para el crecimiento y desarrollo de *L. monocytogenes* (Jetten y Vogels, 1972; Eady y col., 1983; Villani y col., 1994).

El crecimiento de *L. monocytogenes* no se vio influenciado cuando el número de bacterias ácido lácticas era $< 10^7$ ufc/ml. Sin embargo, desde el momento en que las bacterias ácido lácticas tenían una concentración $>10^7$ ufc/ml, se producía un incremento significativo en la concentración de ácido láctico en el medio, y consecuentemente, había un descenso del pH del medio (Devlieghere y col., 2001).

La inhibición de *L. monocytogenes* por bacteriocinas producidas por *Pediococcus acidilactici* pueden servir de

control contra este patógeno en los productos cárnicos fermentados. Así, donde la producción de ácido es insuficiente, la producción de bacteriocinas podría facilitar la reducción de la concentración de *L. monocytogenes* (Foegeding y col., 1992). En los productos cárnicos fermentados, los *Pediococcus* spp. producen componentes ácidos que colaboran en la formación del sabor del producto, y producen pediocinas que tienen una actividad anti listeria (Luchansky y col., 1992). *L. monocytogenes* es sensible a la bacteriocina antilisteria denominada curvaticín 13, producida por *Lactobacillus curvatus* SB13, y que está presente en los productos cárnicos fermentados (Bouttefroy y col., 2000).

1.7.2 Salmonella

▪ Temperatura

La capacidad de crecimiento de *Salmonella* se reduce sustancialmente si la temperatura es inferior a los 15°C, mientras que el crecimiento de la mayoría de *Salmonella* se evita si la temperatura es inferior a los 7°C. Así, el almacenamiento de los alimentos perecederos debe

mantenerse por debajo de la temperatura mínima de crecimiento del microorganismo. Se ha descrito la capacidad de *Salmonella* para crecer a temperaturas inferiores a los 5°C, pero en muchos casos no se ha confirmado (D'Aoust, 1994).

La muerte de *Salmonella* es mayor durante el proceso de congelación que durante el tiempo que puede permanecer congelado un alimento. El descenso de la viabilidad de *Salmonella* es mucho mayor en el intervalo de temperaturas entre 0°C y -10°C que entre el de -17°C a -20°C (Georgala y Hurst, 1963; ICMSF, 1996). Aunque la congelación puede afectar muy seriamente a la supervivencia de *Salmonella*, no garantiza su destrucción total en los alimentos. Así, durante este proceso, *Salmonella* quedará muy dañada y, por este motivo, en el momento de analizar los alimentos almacenados en congelación se recomienda realizar un proceso de pre enriquecimiento.

La muerte de la bacteria se producirá si se excede la temperatura máxima de crecimiento, 49,5°C. Valores situados

por encima de ésta serán adecuados para almacenar los alimentos en condiciones de temperaturas elevadas, evitándose el crecimiento de *Salmonella* (ICMSF, 1996). Estos valores quedan reflejados en la Tabla 4.

TABLA 4.
LÍMITES DE CRECIMIENTO PARA *SALMONELLA*

Condiciones	Mínimas	Óptimas	Máximas
Temperatura	5,2°C	35°C- 43°C	49,5°C
pH	3,8	7-7,5	9,5
Aw	0,94	0,99	>0,99

Fuentes: World Journal of microbiology and Biotechnology

Salmonella es muy sensible al calor y la resistencia a este parámetro es muy rara. La resistencia al calor viene influenciada por la actividad de agua, por la naturaleza de los solutos y por el pH del medio. Esta resistencia se incrementa cuando la actividad de agua del substrato se reduce. Si reducimos el pH se reduce la resistencia al calor. También se ha observado que con la misma actividad de agua hay más

resistencia al calor si hay sacarosa en el medio que si hay CINA (ICMSF, 1996).

- **pH**

El pH mínimo de crecimiento es 3,8 y el máximo 9,5. El tipo de ácido presente es muy importante. Los ácidos inorgánicos como el ClH y el ácido cítrico, permiten el crecimiento de *Salmonella* hasta valores de pH cercanos a 4, mientras que el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico, tienen un mayor poder bacteriostático impidiendo el crecimiento de *Salmonella* a pH inferiores a 5 (ICMSF, 1996).

En general, la actividad bactericida de todos los ácidos se incrementa linealmente con la concentración del mismo. De esta forma, concentraciones = 4% de ácido son necesarias para reducir = 2 log el número de células de *S. typhimurium*. Los ácidos orgánicos han sido investigados por su actividad bactericida y porque todos ellos son generalmente reconocidos como seguros; por ello, pueden ser utilizados como conservantes en muchos alimentos. El ácido acético y el

propiónico se han encontrado como los que tienen mayor efecto inhibitor de *Salmonella*. El ácido málico y el ácido láctico han presentado una actividad intermedia, y el ácido tartárico y el cítrico tienen una menor actividad inhibitora (Bautista y col., 1997). En general, concentraciones = 2% de ácido producen reducciones = 7 log ufc/ml (Dickson y Anderson, 1992; Thomson y col., 1967; Tamblyn y col., 1993; Tamblyn y Conner, 1997a, 1997b).

El potencial de óxido-reducción es otro factor importante que afecta al crecimiento de esta bacteria. Aunque *Salmonella* pueda crecer en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis, este crecimiento puede verse inhibido por potenciales de óxido-reducción inferiores a -30mV (ICMSF, 1996).

- **Actividad de agua (aw)**

La actividad de agua es uno de los factores que más afecta al crecimiento de *Salmonella*. El límite inferior se sitúa en valores de 0,945, pero *Salmonella* puede sobrevivir durante un año o más en alimentos que tengan actividades de agua inferiores,

tales como el chocolate, la pimienta negra, las gelatinas o la manteca de cacahuete.

Las sales presentes en los alimentos o añadidas para conservarlos tienen un efecto bacteriostático, ya que las sales captan el agua presente en el alimento haciendo disminuir la actividad de agua e impidiendo el crecimiento de la bacteria. El crecimiento de *Salmonella* en los alimentos se ve inhibido por la presencia de un 3-4% de ClNa. También se inhibe el crecimiento de *Salmonella* si existen concentraciones de sal en carne del orden del 5,3% (ICMSF, 1996).

- **Altas presiones**

Presiones con valores de 500-700 MPa matan rápidamente las células vegetativas de bacterias, levaduras y hongos, aunque las esporas bacterianas son mucho más resistentes. Ciertos enzimas son inactivados y algunas proteínas solubles son desnaturalizadas, pero los compuestos responsables del sabor no se ven afectados. Los tratamientos a altas presiones pueden inactivar los microorganismos a temperatura ambiente sin la

utilización de conservantes, permitiendo que se mantengan las características organolépticas (Mackey y col., 1994; Tholozan y col., 2000).

La reducción del número de células viables de *S. thompson* en 105 ufc/g fue debido a exposiciones de 250 MPa durante 10 minutos. El tratamiento a 500 MPa durante el mismo tiempo reduce el número de células viables en 108 ufc/g (Mackey y col., 1994).

Ponce y col. (1999) estudiaron la destrucción de *S. enteritidis* inoculada en huevo entero líquido a una concentración de 10^7 - 10^8 ufc/ml bajo diferentes condiciones de presión (350 y 450 MPa), de temperatura (50, 20, 2 y -15°C) y de tiempo (5, 10 y 15 minutos). El índice de inactivación se incrementa con el aumento de la presión y del tiempo de exposición, siendo la destrucción mínima de $1 \log_{10}$ a 350 MPa y temperatura de -15°C durante 5 minutos e inactivándose totalmente a temperaturas de 50°C (hasta $8 \log_{10}$). El efecto de la presión se vio mejorado y potenciado por temperaturas elevadas.

1.8 Comportamiento de los Patógenos Indicadores

1.8.1 Listeria

El crecimiento de *L. monocytogenes* está influenciado por muchas condiciones ambientales tales como la temperatura, la actividad de agua, la concentración de ClNa, las condiciones atmosféricas, el pH y la accesibilidad a los nutrientes.

En la leche cruda la temperatura es el factor determinante para el crecimiento de *L. monocytogenes*, mientras que en los quesos frescos, aunque la temperatura tiene un papel importante en la tasa de crecimiento de *Listeria*, hay otros factores determinantes. Cantidades pequeñas de ClNa tienen un efecto inactivador sobre *Listeria* (McClure y col., 1990; Sorrells y col., 1989; Shineman y Harrison, 1994; ICMSF, 1998).

L. monocytogenes tiene una mayor capacidad de crecimiento en leche cruda que en carne de ternera y de pollo, y esto se ha demostrado por las diferencias significativas en el tamaño de las poblaciones de *Listeria* después de cierto tiempo, tanto en leche cruda como en sus derivados, bajo las mismas condiciones de almacenamiento (Shineman y Harrison, 1994).

También debe tenerse en cuenta la influencia que sobre el crecimiento de

Listeria, posee la microflora acompañante. Marshall y Schmidt (1991) han demostrado que la presencia de *Pseudomonas* estimula el crecimiento de *L. monocytogenes* en los lácteos.

La inhibición de *L. monocytogenes* en diferentes tipos de productos lácteos es una compleja interacción entre el temperatura y otros factores, todavía por precisar. La diferencia detectada en la tasa de crecimiento de *L. monocytogenes* puede ser atribuida parcialmente a las inherentes diferencias de temperaturas de los distintos productos lácteos (Shineman y Harrison, 1994).

Las sales y los nitritos que se encuentran en los quesos frescos y otros productos lácteos curados afectan a la supervivencia de la *L. monocytogenes*. Generalmente estos productos inhiben el crecimiento y la supervivencia de *Listeria*. Sin embargo, Farber (1989) demostró que se producía un incremento de la resistencia de *Listeria* al calor en quesos con sales, salmueras y especias. Esto hacía que la temperatura de 68°C no fuera

suficiente para reducir los niveles de *L. monocytogenes* por debajo de poblaciones detectables en productos lácteos curados.

Las toxiinfecciones alimentarias producidas por *L. monocytogenes* en los años anteriores a 1989 se asociaban a alimentos como vegetales crudos, ensaladas de col, leche cruda o bien a queso de estilo mejicano, pero fue 1911 donde se la detecta en animales, detectándose en 1929 el primer caso en humanos (FDA ,1992).

En 1983 cuando por primera vez se describió un caso de *L. monocytogenes* asociado a leche cruda contaminada, y concretamente al consumo de quesos frescos estilos mexicano (Johnson y col., 1990; Line y Harrison, 1992). A partir de este momento, se intensificaron los estudios. Así, Bailey y col. (1989) examinaron 90 muestras de lácteos del sureste de los E.E.U.U. y encontraron que un 23% de las muestras estaban contaminadas con *L. monocytogenes*. En Inglaterra, el 60% de las muestras de productos lácteos estudiadas fueron positivas a *L. monocytogenes* (Pini y Gilbert, 1988).

Según Clouser y col. (1995) *L. monocytogenes* no ha sido detectada en los lácteos en ninguno de los procesos anteriores al prensado y al moldeado del animal durante el proceso de producción.

1.8.2 Salmonella

La incidencia de *Salmonella spp.* es de 14,43 casos por 100.000 habitantes (CDC 2006). En Chile es endémica y está asociada principalmente a consumo de alimentos y aguas contaminadas. Esta bacteria es causante de enfermedades gastrointestinales, principalmente diarreas, que incluso pueden llevar a la muerte si no son tratadas debidamente (Álvarez et al. 2004). Las diarreas por *Salmonella spp.*, llamadas salmonelosis, son causadas principalmente por especies zoonóticas, con brotes de origen alimentario; en un 40% hay productos lácteos involucrados. Pueden causar generalmente diarreas secretoras, aunque puede haber casos disentéricos; en América Latina las diarreas por *Salmonella* corresponden de 0,5 a 4% de los episodios. Desde 1994 la frecuencia de aislamientos de *Salmonellas* cambió de *S. thypi* a *S. Enteritidis*. Actualmente esta última especie posee la de mayor frecuencia de aislamiento, con un

47%, aproximadamente (Woodward et al. 1997; Fica et al. 2001).

En la Región Andina del Ecuador la ocurrencia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos es de 20 brotes mensuales, y la realidad puede superar la cifra, debido a la sub notificación existente (Armendáriz, 2002). Salmonelosis es una enfermedad que puede ser asintomática, lo que genera un gran problema porque es una enfermedad altamente contagiosa, debido a la baja dosis infectante necesaria.

Los principales factores que contribuyen a las toxiinfecciones alimentarias provocadas por *Salmonella* a través de los alimentos derivados de lácteos, según Bryan y Doyle (1994), son:

- 1.- La refrigeración incorrecta de los alimentos.
- 2.- La preparación anticipada de los alimentos.
- 3.- La elaboración inadecuada o el proceso térmico inadecuado.

4.- La contaminación de los alimentos por un manipulador enfermo.

5.- El recalentamiento inadecuado de los alimentos cocinados.

6.- El almacenamiento en caliente de los alimentos.

7.- Las contaminaciones cruzadas entre alimentos crudos y cocidos.

8.- La limpieza inadecuada de los utensilios que están en contacto con los alimentos.

9.- La ingestión de alimentos crudos.

Durante el periodo de 1968 a 1977 en E.E.U.U., la leche cruda y productos lácteos fueron las responsables directas del 39% de los brotes epidémicos, y también fueron las responsables del 8% de los brotes en los que formaban parte de algún alimento como ingredientes (Bryan, 1980). Los quesos frescos fueron responsables de un 13,3% de los brotes epidémicos.

En otros estudios realizados durante los años 1966 y 1974 en E.E.U.U., los autores concluyeron que los quesos eran responsables sólo del 15% del total de los brotes epidémicos. De ellos, los quesos frescos representaban un 62%, y la leche y otros tipos de quesos un 37% (Horwitz y Gangarosa, 1976; Bryan y Doyle, 1994).

Las razones de este incremento en el número de casos no están totalmente definidas, pero se cree que puede ser debido a una suma de factores, tales como: los cambios en las prácticas de manejo de los animales en las granjas; la utilización de piensos contaminados por *Salmonella*; la utilización de procesos y de procedimientos que permiten y promueven la dispersión y/o crecimiento de la *Salmonella*; el incremento de la población altamente susceptible al patógeno; el aumento de la población que come productos de origen animal crudos o poco cocidos; la mala manipulación de los alimentos durante la preparación de las comidas; y las inadecuadas prácticas de inspección epidemiológica (Bryan y Doyle, 1994; ICMSF, 1998).

Las infecciones por *Salmonella* se producen durante todo el año, pero se detecta un aumento durante el verano y el principio del invierno. Esta variación debe relacionarse con las contaminaciones estacionales de los alimentos y con el crecimiento más acelerado del patógeno cuando las temperaturas ambientales son altas (Bryan y Doyle, 1994; Plachá y col., 2001).

Durante el proceso de moldeado y prensado hay una transferencia continua de microorganismos desde las manos de los trabajadores, a los utensilios y a las superficies de los equipos y, también, hay una transferencia de microorganismos entre las piezas de quesos.

Cuando se prensan las piezas de quesos de forma manual o bien mecánicamente es fácil que haya una contaminación de las piezas. Por lo tanto, el proceso de prensado y moldeado es uno de los puntos de contaminación cruzada más importantes en todo el proceso de la producción de quesos. (Bryan y Doyle, 1994; ICMSF, 1998).

La prevalencia de *Salmonella* en los productos lácteos varía desde un 2% a un 100%, siendo la media de un 30%. La concentración de células de *Salmonella* en las piezas de quesos frescos es baja, alrededor de 1 a 30 células, aunque ocasionalmente se pueden encontrar 10⁴ ufc/100 g. (Mulder y col., 1977).

1.9 Objetivos Generales y Específicos

1.9.1 Objetivos Generales

El objetivo de será determinar la incidencia de quesos frescos de mayor venta en supermercados en la ciudad de Guayaquil, contaminados con *Listeria* y *Salmonella*, como una base para futuros levantamientos estadísticos.

1.9.2 Objetivos Específicos

- Detectar la presencia de *Listeria* y *Salmonella* en los quesos frescos de mayor venta en los supermercados de la ciudad de Guayaquil y su efecto en el consumidor.

- Contrastar los resultados obtenidos mediante métodos de detección rápida con los obtenidos de métodos tradicionales, para evidenciar su confiabilidad en la industria.

CAPÍTULO 2

2. DISEÑO METODOLÓGICO

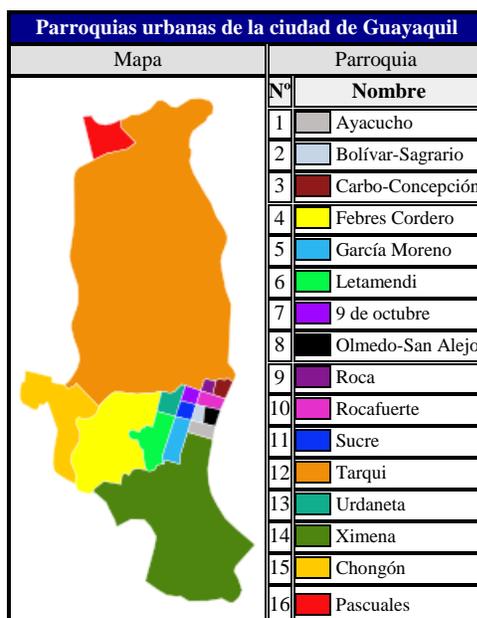
Con los antecedentes encontrados se realiza el análisis para demostrar los objetivos trazados, en donde se definen los métodos para obtener resultados que sean veraces.

Se logra la definición de un método de muestreo que permita disminuir el número de muestra dentro de un gran segmento muestral. Se definen los métodos de análisis; un método de rápida detección y un método tradicional para corroborar los datos obtenidos por el método rápido. Estadísticamente se realiza una concordancia entre los dos métodos y evidenciar de la confiabilidad

de los métodos y los resultados. Se demuestra la incidencia de los microorganismos indicadores por el tipo de Supermercado y por marca de queso muestreada.

2.1 Identificación del sector muestral

El presente trabajo se realizó en la ciudad de Guayaquil dentro de la zona urbana. Guayaquil tiene un total de 16 parroquias urbanas que conforman la cabecera cantonal, y se encuentran ubicadas al noreste del cantón. La parroquia Tarqui es la de mayor área y población, ocupando casi en su totalidad la mitad superior la ciudad, con una población de 935.486 habitantes según datos ofrecidos a partir del censo poblacional realizado en el 2010. La segunda más extensa y poblada es la de Ximena con 500.076 habitantes, y ocupa la mayor parte del sur de la ciudad. La tercera más poblada y la más representativa de las parroquias urbanas de Guayaquil es Febres Cordero, con 341.334 habitantes.



Elaborado por: Plaza Luis, 2012

FIGURA 2.1 DISTRIBUCIÓN ZONAL DE LA CIUDAD DE GUAYAQUIL

La ciudad de Guayaquil presenta un clima tropical benigno, con una temperatura que oscila entre los 28 y 34°C. Es la ciudad con mayor densidad de población en el Ecuador, con un total de 2.526.927 habitantes en su aglomeración urbana según el último censo en el 2010 en la que incluye la población urbana de Guayaquil, teniendo una distribución socio económica muy inequitativa. Donde el nivel Alto esta con el 7%, nivel Medio Típico con el 27%, nivel Medio Bajo con el 42% y el nivel Bajo con el 24%.

Los quesos frescos que son comercializados en los diferentes supermercados, son manufacturados principalmente en la región andina en su mayoría. Siendo las provincias de Imbabura, Bolívar, Chimborazo y Tungurahua los mayores proveedores en el mercado guayaquileño.

El mercado guayaquileño de quesos es muy dinámico; de acuerdo con las investigaciones de Pulso Ecuador, un 84,3% de los hogares urbanos de las principales parroquias de guayaquileñas consumen regularmente este producto; esto representa algo más de un millón de hogares. Indudablemente, el mercado más dinámico es el del queso fresco; su tradición y precio son factores decisivos a la hora de elegirlo: 72,8% de los hogares que compran regularmente queso adquieren ese tipo. La variedad mozzarella (10,5%) y los quesos maduros (4,8%) son también predilectos por una gran cantidad de ecuatorianos; aunque, el precio de estos productos hace que su consumo se concentre mayormente en los hogares de altos ingresos. (Pulso Ecuador, 2008)

En el Guayaquil urbano, mensualmente se consumen 632 mil kilos de queso de todas las variedades. El consumo promedio por hogar alcanza las 2,5 unidades de 500 gramos.

El 81,5% del mercado de quesos corresponde a la variedad del fresco, que contempla el queso de mesa, de comida, el amasado, el criollo, entre otros.

El 10,3% del gasto mensual corresponde al queso mozzarella, el 4,3% a las variedades de maduros y semi-maduros, y el restante 3,8% a otras variedades. (Manifiestos, 2008)

A la hora de elegir un queso, las preferencias de los guayaquileños son muy variadas; sin embargo, la calidad (37,5%) en donde se agrupan principalmente el sabor, lo saludable del producto y su precio (21,1%), son los factores decisivos para los consumidores, quienes en su mayoría, prefieren adquirirlo en un supermercado (40,2%), en una tienda de barrio (29,8%) o en el mercado (20%). (Manifiestos, 2008)

El mercado ecuatoriano de quesos es bastante complejo; más de 300 marcas compiten para incrementar su participación de mercado; no obstante, de entre ellas, existen exitosas empresas que lideran el mercado, con muchos años de tradición y presencia en el mercado. (Apracom, 2012)

Con los antecedentes del consumo de quesos en general, la ciudad de Guayaquil, por su zonificación y nivel socio económico de sus habitantes. Se toma en consideración la parroquia con mayor extensión territorial por ende la de mayores habitantes y con la particularidad de tener todos los niveles socio económicos dentro de la misma. Definiendo a la parroquia Tarqui, como la población muestral.

Dentro de las preferencias de los consumidores se encuentran empresas productoras de quesos industrializadas, semi-industrializadas y artesanales. Todos estos segmentos abarcan un total de 300 marcas, aproximadamente. Los quesos artesanales no se expenden en supermercados, por ende salen del muestreo. Y los semi-industriales no se expenden en todos los supermercados. Llevando solo al muestreo de quesos frescos de empresas industrializadas.

Está muy claro que el consumo de quesos se da por preferencias y por marcas que tienen tradición dentro del mercado guayaquileño. Y las exigencias del consumidor prefieren adquirirlo en un supermercado, por presentación y seguridad. Por lo cual el criterio, para tomar mis

muestras dentro de la parroquia Tarqui serán marcas tradicionales en los supermercados.

El criterio para la elección de los supermercados donde tomar las muestras, se realiza por el volumen de ventas de los supermercados y la elección de los consumidores.

2.2 Toma de muestras bases.

Primero se realizó un muestreo aleatorio por atributos, en donde se puntualiza los atributos definidos por el sector muestral. En donde se referencia un supermercado perteneciente al sector urbano, pero en Samborondón y en donde hay una concurrencia masiva de consumidores todos los días. En su stock posee tres marcas de quesos que son industrializadas y por su trayectoria son una tradición en el mercado.

Cabe recalcar que en la percha de este supermercado, se encontraron 11 marcas de quesos frescos y con la utilización de la Military StandarMI14TD-1050 en donde se redujo la población de 11 unidades de muestra a tan solo 3. Y por cada marca se tomó 5 muestras. En

este primer muestreo se tomaron 5 quesos de 250 g. por cada marca. Un total de 15 quesos.

Las muestras, fueron tomadas en forma directa de las perchas de refrigeración, luego fueron depositadas y guardadas en un contenedor con hielo a 6°C para mantener las muestras hasta su llegada al laboratorio. El tiempo máximo de transporte de las muestras fue de 5 horas. Este muestreo se realizó en el mes de Agosto del 2011, este supermercado fue muestreado en sólo una ocasión.

Para el muestreo zonal en la parroquia Tarqui de Guayaquil, se realiza una división dentro de la parroquia. Conociendo cual es el número de supermercados presentes en la parroquia. Y de ser de una misma cadena, considerarlo. Existiendo tres cadenas de supermercados dentro de la parroquia con sucursales de 10 a 15 por cada cadena.

Muestreando solo dos cadenas de supermercados de las cuales serán solo tres sucursales por cada cadena. Con las tres mismas marcas en todos los locales visitados. El número de muestras a obtener se calculó

por medio de la utilización de los procedimientos establecidos en la Military Standar MI14TD-1050 que se muestra en el Apéndice 1.



Elaborado por: Plaza Luis, 2012

FIGURA 2.2 PERCHA DE EXPENDIO COMERCIAL EN SUPERMERCADO

2.2.1 Características Físicas de las Muestras.

Se considera necesaria la caracterización de las características de las muestras tomadas. Teniendo un estándar en base a los parámetros físicos de supervivencia de los microorganismos indicadores.

La caracterización de estos parámetros es muy simple; ya que las mismas son entendidas y practicadas por los consumidores. Siendo la razón del enfoque de los parámetros de temperaturas, pH y la caracterización organoléptica.

- *Temperaturas de la percha.*

Las temperaturas de las perchas al momento de la toma de muestras, propinando un criterio más amplio al momento de homologar los resultados y discernir el posible origen en la proliferación y/o crecimiento de los microorganismos.

- *Temperaturas interna de los quesos.*

La importancia en la no ruptura de la cadena de frío es vital en la mantención de la inocuidad de alimentos de alto riesgo como lo son los quesos frescos. En donde el alimento queda expuesto, siendo un foco de contaminación.

Para determinar un buen almacenamiento durante todos los eslabones de la cadena alimentaria para quesos, se verifican las

temperaturas internas en las muestras tomadas. Teniendo una referencia de todo su almacenamiento.

- *pH de los quesos.*

Los valores de pH que favorecen al crecimiento de los microorganismos indicadores deben estar cercanos a la neutralidad. Pero el origen del producto está caracterizado por tener valores de pH ligeramente ácidos.

Las lecturas tomadas en las muestras serán de referencia al momento de concluir si la supervivencia y/o proliferación de los microorganismos es dependiente al valor de pH.

- *Características organolépticas de los quesos.*



Elaborado por: Plaza Luis, 2012

**FIGURA 2.3 EVALUACIÓN SENSORIAL DE LOS QUESOS
FRESCOS**

Se realizan pruebas descriptivas, en estas pruebas tratan de definir las propiedades sensoriales de los quesos y medirlas de la manera más objetiva posible. Aquí no son importantes las preferencias o aversiones de los jueces y no es tan importante saber si las diferencias entre las muestras son detectadas. El propósito es determinar cuál es la magnitud o intensidad de los atributos de los quesos (Anzaldúa-Morales, 1994; Carpenter, 2000). Las pruebas más usadas son las de perfiles sensoriales y el análisis descriptivo cuantitativo, las cuales utilizan diferentes tipos de escalas.

Las características organolépticas que se medirán son el color y el olor de las muestras. Ya que estos atributos son los que evalúa un consumidor al momento de realizar la elección de la compra.

- *Color.*

Uno de los atributos predominantes en los quesos de cara al consumidor es su color. El color es el primer contacto que tiene el consumidor con los quesos y posteriormente los juzga por su

olor. Esto es contundente, ya que en innumerables pruebas se ha comprobado que cuando el color de un alimento cambia, sin alterar su olor se obtiene una respuesta de rechazo por parte de los consumidores (Badui, 1993).

Se utilizaron cuadritos de papel de 2 cm², previamente codificados con números de tres dígitos para evitar que los candidatos mostraran una preferencia inconsciente en códigos de dos dígitos o de uno. Los colores utilizados fueron; azul y rojo, esto con la finalidad de diferenciar colores básicos, y detectar si algún panelista tenía problemas de identificación de colores tal como se muestra en el Apéndice 2.

Lo que se pidió a los jueces que evaluaran, fue que muestra de queso tenía el color más atractivo que influenciaría en una posible compra.

- *Olor.*

Es la percepción, por medio del olfato, de sustancias volátiles liberadas en los alimentos. Una característica del olor es la intensidad o potencia de éste. La primera, es la persistencia, que aún de retirarse de las sustancias olorosas, la persona

continúa percibiendo el olor. Esto se debe a que las fosas nasales y la mucosa que recubre el interior de estas quedan impregnadas de las sustancias volátiles. Es por eso, cuando se realizan pruebas sensoriales de olor, ventilar muy bien el sitio en donde éstas se realizan (BS 5929: Part 1:1986).

La prueba aplicada fue de aceptación de olores utilizando una prueba hedónica, empleando codificaciones con tres dígitos tal como se muestra en el Anexo 2.

2.3 Elección del Método

En la actualidad existen varios métodos convencionales y rápidos disponibles para la detección e identificación de *Listeria* y *Salmonella* en muestras de alimentos y en ambientes de manufactura de los mismos. Los métodos bacteriológicos convencionales son importantes por varias razones: su empleo permite obtener el microorganismo en cultivo puro, lo que será útil para fines reglamentarios. Siguen siendo los métodos de referencia frente a los cuales se comparan y validan otros métodos. Normalmente, estos métodos son muy sensibles y no requieren un equipamiento sofisticado o costoso.

Algunas desventajas de este grupo de métodos incluyen el periodo de tiempo relativamente largo que se necesita para completar los protocolos, la experiencia práctica que se precisa en varias manipulaciones, la necesidad de productos químicos, reactivos y medios muy diferentes, la posibilidad de que algunos microorganismos contaminantes enmascaren la presencia de las bacterias diana, incluyendo una posible falta de detección de variantes atípicas del microorganismo diana y la subjetividad relativa que supone la interpretación del crecimiento bacteriano en placas de agar con un medio selectivo y diferencial.

El aislamiento e identificación de *Listeria* y *Salmonella* partir de alimentos, muestras medio ambientales y muestras clínicas procedentes de animales, requiere el uso de agentes selectivos y procedimientos de enriquecimiento que mantengan los niveles de microorganismos contaminantes en valores razonables y permitan la multiplicación de *Listeria* y *Salmonella* hasta niveles que sean suficientes para poder detectar estos microorganismos.

Sin embargo, dicho procedimiento necesita tiempos de incubación muy largos, por lo que resulta inadecuado para los requerimientos actuales dentro de empresas industrializadas, que desencadenen brotes de transmisión alimentaria y de casos esporádicos, así como para la puesta en práctica de programas efectivos de análisis de riesgos y control de puntos críticos (HACCP) en las plantas de procesamiento y producción de alimentos.

Es debido a los requerimientos del sector industrial, que en esta tesis se realizará la detección de *Listeria* y *Salmonella* partiendo de métodos de rápida detección; son los usados en la industria. Pero se validaran con los métodos convencionales normados.

Donde se evidenciara falsos positivos, que pudiesen resultar de estos métodos de rápida detección.

Por cada muestra analizada por el método de rápida detección, se realiza la confirmación por duplicado de los métodos tradicionales.

2.3.1 Métodos de análisis y pruebas de detección

Hay que señalar que la metodología “tradicional” o “clásica” se sigue empleando actualmente en los laboratorios de análisis de alimentos ya que, por el momento, las limitaciones de las “nuevas técnicas” no permiten su utilización como métodos de patrón en las industrias alimentarias.

Actualmente, por criterios microbiológicos de normas nacionales e internacionales. Es necesaria una fase previa de enriquecimiento antes de pasar a su aislamiento sobre un medio sólido. La fase de enriquecimiento se utilizaba para incrementar el número relativo de bacterias de la muestra, exponiendo éstas a una serie de condiciones o agentes selectivos que impidieran el crecimiento de otros microorganismos y permitiera el desarrollo de las bacterias. Aún hoy en día, a pesar de la gran selectividad de los medios para las bacterias, se siguen empleando las técnicas de enriquecimiento paralelamente al aislamiento directo.

En los últimos años se han descrito varias técnicas, principalmente las inmunológicas para el aislamiento de *Listeria* y *Salmonella* a partir de alimentos. Aunque estos métodos han sido validados experimentalmente, pocas son, en realidad los que se aplican como técnicas de rutina en los laboratorios de Microbiología de Alimentos. Esto es debido, a que en la mayoría de los casos se requiere un enriquecimiento previo de la muestra según la metodología clásica, y una confirmación microbiológica de las muestras positivas, además de la disponibilidad de unos equipos caros y personal bien capacitado.

- ***Métodos de Análisis para Listeria***

Listeria spp. puede estar presente en número pequeño y es muy frecuente que se encuentre acompañada de un mayor número de otros microorganismos, siendo necesario un enriquecimiento selectivo. Es también necesario, detectar *Listeria spp.* estresadas, función que en parte, la realiza el medio de enriquecimiento selectivo primario con una concentración reducida de inhibidores.

En la identificación convencional para *Listeria* se debe seguir una metodología patrón en este estudio. La metodología patrón para *Listeria* es la Norma Técnica Colombiana NTC 4666. Ya que en las Normas Técnicas Ecuatorianas, no se posee información competente a este microorganismo.

El procedimiento inicia con un enriquecimiento primario en un medio líquido de enriquecimiento Selectivo con concentración reducida de agentes selectivos (caldo Fraser de media concentración o caldo leb-1 o caldo Palcam u otro caldo de enriquecimiento para *Listeria*). Se inocula un medio de enriquecimiento primario que ayudara a la paralización de la lisis de las bacterias presentes en la muestras, con *Listeria*. Se incuba la muestra para ensayo a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Se utiliza agua de peptona tamponada.

El objetivo de este pre-enriquecimiento, es detener la lisis en el medio, dando tonicidad a la flora del medio, se procede a inocular 0,1 ml del caldo y se realizará una siembra en masa. Sobre un medio sólido selectivo; agar OXFORD LISTERIA.

Donde se adiciona el suplemento selectivo. Se incuba a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se examina después de 24 h y si es necesario después de 48 h, para comprobar la presencia de colonias características de *Listeria*.

De acuerdo con la interpretación de los resultados, registrar la presencia o ausencia de *Listeria* en la porción ensayada, especificando la masa en gramos o el volumen en mililitros de la muestra analizada.

- **Métodos de Análisis para Salmonella**

Las cepas de *Salmonella*, cuando presentes en los alimentos, generalmente lo están en pequeños números, algunas veces debilitadas y frecuentemente acompañadas de un gran número de otros miembros de *Enterobacteriaceae*, por tanto, el método NTE INEN 1529-15:2009. Este método no es cuantitativo y solo es aplicable para determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* en los alimentos, en general.

En la primera fase de enriquecimiento, se utilizará agua peptona tamponada. Que es la utilizada para colorantes alimentarios de $\text{pH} > 6$; productos del mar: crustáceos

(camarones, cangrejos, etc.), moluscos (bivalvos, caracoles), pescados; carnes y productos cárnicos; huevos pasterizados, líquido o en polvo, productos con huevo; gelatinas y pos tres de gelatina; frutas y vegetales desecados; productos de panadería y pastelería; pastas alimenticias y quesos.

Este pre-enriquecimiento, se preparara homogenizando con 25g de muestra y 225 cm³ de diluyente, y si es necesario, ajustar el pH a $6,8 \pm 0,2$ con una solución estéril de cloruro de sodio al 2%.

Luego se procede a homogenizar la muestra en el agua de peptona salina, en una fiola previamente esterilizada. Se debe tapar asépticamente y se llevara a incubar por 24 horas con una temperatura de 37°C. Este procedimiento servirá para darle tonicidad al medio donde se encuentren posibles células de *Salmonella*.

Pasadas las 24horas del pre-enriquecimiento, se procede a tomar con una pipeta 0,1 ml del medio donde se encuentra, el

agua de peptona salina junto con la muestra. Seguido a esto se procede a colocar la muestra del pre-enriquecimiento en un caldo selectivo (Caldo de Rapapport), colocado en otra fiola y tapado asépticamente, donde se lo llevara a incubar por 24 horas a una temperatura de 43°C.

Paralelo al inoculo en un caldo selectivo, se procede a tomar 0,1ml respectivamente en caldos de lactosa, sacarosa y glucosa. Llevándolos a incubar 24 horas a una temperatura de 37°C. Siendo esta unas pruebas bioquímicas.

Después de transcurrido el tiempo de incubación del caldo selectivo (Rapapport), se toma muestras para realizar la identificación en agares selectivos. La siembra se realizara en placas de medios sólidos selectivos y diferenciales, con asa de cultivo sembrar en estría sobre la superficie seca de placas de Agar S-S (Salmonella Shigella) y en Agar BPLS (Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose Agar).El fin de esta etapa será la de obtener colonias aisladas. Se invierten las placas, se incubaran a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 h.

Agar Salmonella-Shigella. La mayoría de las colonias típicas de *Salmonella* son opacas o translúcidas, incoloras o de color crema, con o sin centro negro. Las pocas cepas de *Salmonella* que fermentan la lactosa presentan colonias lisas de color rosa o naranja.

En el Agar BPLS, la mayoría de las colonias típicas de *Salmonella* son opacas o translúcidas de color rosa o rojo oscuro, y el medio que las rodea varía de rosa a rojo. Las colonias típicas pueden presentarse incoloras, otras pueden aparecer de un color verde translúcido cuando están rodeadas por colonias de color verde o verde amarillento de microorganismos fermentadores de la lactosa o sacarosa. Las cepas de *Salmonella* fermentadoras de la lactosa (menos del 1%) presentarán colonias de color verde amarillento o verde.

Se examinarán las placas entre las 20 y 24 horas, si el crecimiento es pobre y no aparecen colonias típicas de

Salmonella, examinarlas después de 24 horas más de incubación. Cualquier colonia típica o sospechosa debe ser confirmada, ya que reconocer las colonias de *Salmonella* supone mucha experiencia y el aspecto puede variar no solo de especie a especie sino también de lote a lote de medio de cultivo.

De cada placa de medio selectivo se deberán seleccionar 5 colonias típicas o sospechosas bien aisladas y sembrarlas directamente en agar TSI. Si en una placa hay menos de cinco colonias típicas, sembrar todas.

Al inocular en agar TSI, inoculando con asa de aguja, flameando la aguja previamente. Sembrar por picadura la columna del agar y la superficie inclinada en estría, taparlos con un tapón flojo. Incubar los tubos de TSI entre 35 y 37° C por 24 ± 2 horas y 48 ± 2 horas, respectivamente.

Si a partir de uno, o de ambos medios de enriquecimiento selectivo, se aísla *Salmonella* en las placas de agar selectivo,

reportar: "Se aisló *Salmonella* en 25 g de muestra examinada"; se debe mencionar el medio o medios de enriquecimiento selectivo.

- ***Pruebas de Detección para Listeria***

Las principales pruebas inmunológicas desarrolladas para la detección de *Listeria* en alimentos se basan fundamentalmente en el empleo de anticuerpos monoclonales obtenidos frente a proteínas presentes en todas las especies del género aplicados a una técnica ELISA.

En esto se basa, por ejemplo, la prueba Listeria-Tek<OrganonTeknika Corp. Durham, NC) (Butman y col., 1998; Durham y col., 1990), el sistema VIDAS-Listeria (BioMérieux) o la prueba EIA <Sorin y col. <1992).La ventaja de estas técnicas ELISA es que permiten el procesamiento de gran cantidad de muestras, con lo que en el caso de resultar el análisis negativo son de gran utilidad. Sin embargo, únicamente pueden detectar la presencia o ausencia de microorganismos del género *Listeria* en la muestra, sin precisar si se trata de *L. monocytogenes* o de alguna otra especie, siendo, además técnicas cualitativas que no dicen el número de colonias presentes en las muestras.

Los métodos inmunológicos disponibles comercialmente en el medio, han conseguido la validación mediante sistemas oficiales entre los que se encuentra el VIDAS Listeria species Xpress (bioMérieux), validado por la AFNOR; el TransiaPlate Listeria ELISA (Transia, DiffchambLtd), validado por la AFNOR; el EIAFOSS Listeria automated ELISA (Foss Electric), validado por el Instituto de Investigación de la AOAC; el método inmuno cromatográfico REVEAL para Listeria (Neogen Corporation), validado por el Instituto de Investigación de la AOAC; el método inmuno cromatográfico Clear view Listeria Rapid Test (Oxoid), validado por la AFNOR, el EMMAS y el Instituto de Investigación de la AOAC, y la prueba Listertest (Vicam) basada en la separación inmuno magnética validada por el Instituto de Investigación de la AOAC.

De los métodos citados, el método REVEAL para Listeria es uno de los de mayor uso dentro de los laboratorios de calidad de las industrias ecuatorianas. (Apracom, 2012) Se emplea para la detección de productos lácteos, verduras, marisco, carnes

crudas y de ave, así como para la detección de antígenos de *Listeria spp.* en carnes procesadas y de ave. En un estudio multi laboratorial, se evaluó una modificación de este protocolo de enriquecimiento, que consistía en el uso de caldos semi-Fraser y Fraser (método oficial 2004.06 de la AOAC) y no se encontraron diferencias significativas entre este método y el método oficial 999.06 de la AOAC.

Para la determinación de *Listeria*, en quesos frescos. El procedimiento para el uso, interpretación de resultados y la sensibilidad del REVEAL 2.0 SISTEMA ANALITICO PARA LISTERIA, es pre-escrito por el fabricante.



Elaborado por: Plaza Luis, 2012

FIGURA 2.4 KIT DE RÁPIDA DETECCIÓN PARA *LISTERIA*

El método REVEAL 2.0, nos provee con fundas de tipo stomacher, frascos con medio LESS y dispositivos analíticos REVEAL. El procedimiento indica:

1.- Transferir el contenido de un frasco de medio LESS a una funda tipo Stomacher y colocar 225 ml de agua esterilizado. 2.- Sujetar la funda y mezclar el contenido fuertemente hasta que se disuelva.

3.- Colocar 25 gramos de muestra en la bolsa tipo Stomacher y homogenizar de 1 a 2 minutos.

4.- Incubar durante al menos 27 horas pero no más de 48 horas.

5.- Retirar cuidadosamente la muestra de la estufa de incubación, sin alterar los residuos de alimentos que pueda contener. Transferir 2 ml de la región superior del caldo a un tubo pequeño.

6.- Colocar el tubo de vidrio en un baño maría a 80°C durante 20 minutos.

7.- Enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente.

8.- Retirar el dispositivo de detección de la funda metálica, colocar la muestra en la ventana y rotularla.

9.- Esperar 20 minutos y esperar resultados.

Nota: En el kit siempre deberá presentar una línea que es la de reacción. Si esta línea es ausente. Se deberá rechazar el kit. Repitiendo la prueba.

Para la interpretación de Resultados se deberá tener en consideración los siguientes parámetros:

- Líneas en las zonas C y T a los 20 minutos: positivo.
- Línea en la zona C, pero no en la T: Negativo.
- Si no aparece ninguna línea en la zona C, aunque hay una línea en la zona T: nulo.

Este método posee una sensibilidad. De 1-10 UFC/25gramos.

- ***Pruebas de detección para Salmonella***

Para la determinación de *Salmonella*, tanto en quesos frescos y huevos frescos. Se utilizó un método de detección rápida. Reveal 2.0 ANÁLISIS DE *SALMONELLA* versus Método Tradicional.



Elaborado por: Plaza Luis, 2012

FIGURA 2.5 KIT DE RÁPIDA DETECCIÓN PARA SALMONELLA.

Procedimiento

Reveal 2.0 ANALISIS DE *SALMONELLA*

- 1.- Transferir el contenido de un frasco REVIVE a una funda, agregar 200 ml de agua destilada pre-calentada a 42°C. Agitando hasta homogenizar.
- 2.- Se toman 25 g de muestra del alimento (la muestra debe estar a temperatura ambiente), en la funda stomacher donde se encuentra el medio REVIVE. Ajusta la funda y homogeniza la muestra en el medio. Agitar la funda enérgicamente de lado a lado.

3.- Sin ajustar demasiado, cierre la funda y coloque sobre un estante en una incubadora a una temperatura de $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas.

4.- Reconstituir 2xRV (Rapapport) en una funda, añadiéndole agua estéril y purificada, precalentada a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Agitar vigorosamente hasta que se disuelva. Mantener a 2xRV preparado a 42°C hasta su uso.

5.- Sacar la funda de muestra REVIVE de la incubadora y colocarlos en soporte adecuado.

6.- Agregarle los 200 ml de enriquecimiento 2xRV selectivo a 42°C a la funda de muestra. Homogenizar cuidadosamente de lado a lado.

7.- Cerrar la funda sin ajustarla y colocarla en un soporte adecuado. Incubar a $42 \pm 0^{\circ}\text{C}$ durante 16-24.

Retirar la funda de la incubadora, homogenizar y transferir 200 μl u 8 gotas a un pocillo.

8.- Colocar una tirilla de análisis, en orientación de las flechas e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos y esperar.

Interpretación de Resultados.

- Línea en zona de control y prueba en 15 minutos. Positivo.
- Línea en zona de control durante 15 minutos. Negativo.
- Si no aparece la línea de control. La prueba se considera invalida, debiendo repetir la muestra y analizado con otro dispositivo.
- Observaciones después de 20 minutos no son validas.

Este kit posee una sensibilidad de, 1 ufc/unidad analítica y de 10⁶ ufc/ml después de enriquecimiento.

2.3.2. Métodos de cultivo utilizados

- **Listeria**

Agua Peptona tamponada (Acumedia, Neogen)

Diluyente utilizado para la homogeneización de muestras alimentarias, según las recomendaciones del fabricante. Su composición, expresada en gramos por litro, es la siguiente:

- Peptona: 10,0 g
- Cloruro sódico: 5,0 g
- Fosfato disódico: 9,0 g
- Fosfato dipotásico: 1,5 g

Para su reconstitución se disuelven 25.5 g del polvo deshidratado en un litro de agua destilada. Se distribuye en tubos a razón de 9 ml o bien en frascos a razón de 225 ml y se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Agar Oxford Listeria (Acumedia, Neogen)

Es un medio diferencial para el aislamiento de *Listeria spp.* en muestras alimenticias y clínicas. Siendo su composición:

- Agar Columbia: 39 g
- Esculina: 1 g
- Citrato amónico de hierro (III): 0,5 g
- Cloruro de litio: 15 g
- Agua: 1 000 ml
- Proteasa peptona: 23,0 g

- Almidón: 1,0 g
- Cloruro sódico: 5,0 g
- Agar: 9 g a 18 g

Para la preparación, se disuelven los componentes o el medio completo deshidratado en agua destilada por ebullición.

Se ajusta el pH si es necesario, para que después de la esterilización sea de $7,0 \pm 0,2$ a 25 °C. Se esteriliza durante 15 min en autoclave a 121 °C.

La composición del Suplemento de Enriquecimiento Oxford Listeria, expresada en miligramos, es la siguiente:

- Cicloheximida: 200,0 mg
- Sulfato de colistina: 10,0 mg
- Clorhidrato de acriflavina: 2,5 mg
- Cefotetan: 1,0 mg
- Fosfomicina: 3,0 mg

Se calienta el Agar Oxford Listeria entre 45-50°C y se le añade el contenido de un vial de Suplemento de Enriquecimiento Oxford Listeria, disuelto previamente en 2,5 ml de etanol y pasado 5 minutos, se agregan 2,5 ml de agua destilada estéril.

- ***Salmonella***

Agua Peptona salina (Acumedia, Neogen)

Diluyente utilizado para la homogeneización de muestras alimentarias, según las recomendaciones del fabricante. Su composición, expresada en gramos por litro, es la siguiente:

- Peptona: 10,0
- Cloruro sódico: 5,0
- Fosfato disódico: 9,0
- Fosfato dipotásico: 1,5.

Para su reconstitución se disuelven 25.5 g del polvo deshidratado en un litro de agua destilada. Se distribuye en

tubos a razón de 9 ml o bien en frascos a razón de 225 ml y se esteriliza en el autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Se añade una solución salina con una concentración del 2%. Siendo el objetivo realizar un pre-enriquecimiento selectivo.

Caldo de Rapaport Vassiliadis (Acumedia, Neogen)

Medio líquido para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella* spp. a partir de muestras alimentarias y otros materiales. Su composición, expresada en gramos por litro, es la siguiente:

- Soja peptona: 4,5
- Cloruro sódico: 7,2
- Fosfato monopotásico: 1,260
- Fosfato dipotásico: 0,180
- Cloruro magnésico: 13,50
- Verde malaquita: 0,036

Para preparar el medio se suspenden 26.8 g del polvo en un litro de agua destilada y se calienta hasta disolverlo. Se distribuye en

recipientes adecuados y se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C. El medio tendrá un pH de 5.2 aproximadamente.

Agar Salmonella Shigella (S-S) (Acumedia, Neogen)

Este es un medio diferencial y selectivo, para patógenos *Yersinia enterocolitica* y *S. shigella*. Su composición expresada en gramos por litro, es la siguiente:

- Extracto de almidón: 5,0 g
- Peptonas: 10,0 g
- Lactosa: 10,0 g
- Sales biliares: 8,5 g
- Deoxycholate de Sodio: 10,0 g
- Cloruro de Calcio: 1,0 g
- Citrato de sodio: 10,0 g
- Tiosulfato de sodio: 5,42 g
- Citrato férrico: 1,0 g
- Verde brillante: 0,0003 g

➤ Rojo neutro: 0,025 g

➤ Agar-Agar: 15,0 g

Para preparar el medio se suspenden 76 g del polvo en un litro de agua destilada y se calienta hasta hervir. Se distribuye en recipientes adecuados y se enfría hasta unos 50°C. No se lleva al autoclave. El medio tendrá un pH de 7.4 aproximadamente.

**Agar Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose (BPLS)
(Acumedia, Neogen).**

Este es un medio selectivo sólido para la identificación de *Salmonella spp.*, con excepción de *S. typhosa* y *Shigella*, la identificación se realiza por muestras alimentarias y clínicas. Su composición en gramos por litro es la siguiente:

➤ Peptona de carne: 5,0 g

➤ Peptona de caseína: 5,0 g

➤ Extracto de carne: 5,0 g

➤ Cloruro de Sodio: 3,0 g

- Fosfato disódico hidrogenado: 2,0 g
- Lactosa: 10,0 g
- Sucrosa: 10,0 g
- Rojo fenol: 0,08 g
- Verde brillante: 0,0125 g
- Agar-Agar: 12,0 g

Para preparar el medio se suspenden 57 g del polvo en un litro de agua destilada y se calienta hasta disolverlo. Se distribuye en recipientes adecuados y se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C. El medio tendrá un pH de 6.9 aproximadamente.

Agar Triple Sugar Iron (TSI) (Acumedia, Neogen)

Esta prueba se recomienda para la identificación de patógenos entéricos Gram-negativos. Se emplea para la detección de la fermentación de azúcares. Su composición en gramos por litro es la siguiente:

- Extracto de carne: 3,0 g
- Extracto de levadura: 3,0 g
- Peptona: 15,0 g
- Proteosa-Peptona: 5,0 g
- Lactosa: 10,0 g
- Sacarosa: 10,0 g
- Glucosa: 1,0 g
- Sulfato ferroso: 0,2 g
- Cloruro de Sodio: 5,0 g
- Tiosulfato de sodio: 0,3 g
- Agar: 12,0 g
- Rojo fenol: 0.024 g

Para preparar el medio se suspenden 65 g del polvo en un litro de agua destilada y se calienta hasta disolverlo. Se distribuye en recipientes adecuados y se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C. El medio tendrá un pH de 6.9 aproximadamente.

2.4 Métodos de Análisis Estadísticos.

Los resultados obtenidos a partir de las muestras por analizar, serán tabuladas en Minitab 15.0 para determinar la prevalencia de *Listeria spp.* y *Salmonella spp.* en las diferentes marcas de quesos. También se realizara una validación comparativa en donde se evidenciara el nivel de concordancia de los métodos utilizados.

El estudio de validación comparativa incluyó tres características de la prueba: precisión relativa (CA) y especificidad (SP), y éstos se calcularon y se define como se ha descrito previamente. Los resultados falsos negativos (FN) los resultados fueron definidos como muestras en las que se obtienen resultados positivos por el método rápido y resultados negativos con el método convencional. Los falsos positivos (FP) los resultados fueron definidos como las muestras con resultados negativos en el método rápido y los resultados positivos del método convencional. Kappa de Cohen (κ) se calculará según lo descrito por NMKL para cuantificar el grado de acuerdo entre los dos métodos ($\kappa > 0,80$ significa muy buen acuerdo entre los métodos). Con el coeficiente de Kappa de Cohen, se trata de medir el grado de acuerdo entre los dos métodos que clasifican el análisis microbiológico propuesto.

Los resultados obtenidos en el ensayo colectivo se analizarán de acuerdo a las recomendaciones de NordVal. SP se calculó para las muestras por la siguiente ecuación: $E = (1 - [FP/N]) \times 100\%$, donde N refiere al número total de muestras. AC se calculó para todos los niveles de adición por la siguiente ecuación: $AC = ([PA + NA + FP] / N) \times 100\%$, donde N es el número de muestras ensayadas.

TABLA 5
NIVEL DE CONCORDANCIA SEGÚN EL VALOR DE KAPPA

Valor Kappa	Grado de Acuerdo
< 0	Sin acuerdo
0,0 - 0,2	Insignificante
0,2 - 0,4	Bajo
0,4 - 0,6	Moderado
0,6 - 0,8	Bueno
0,8 – 1,0	Muy bueno

Elaborado por: Plaza Luis, 2012

2.5 Validación.

Para garantizar que los resultados obtenidos en este trabajo. Hay que tomar la responsabilidad de que los resultados que se encuentren sean exactos, válidos y confiables, a tal punto que proporcionen información útil acerca de la inocuidad y calidad sanitaria de los quesos frescos que se expenden en los supermercados de la ciudad de Guayaquil.

Por esto se rige la necesidad de comparar los análisis que se realicen por un patrón normado. Siendo en este caso un laboratorio acreditado por la OAE.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la toma de muestras se seleccionaron los supermercados con mayor expendio de los quesos en estudio, se descartaron aquellos lugares donde no se encontraron las marcas tradicionales en el mercado guayaquileño.

En total se analizaron 51 muestras de queso distribuidas de la siguiente manera.

TABLA 6
NÚMERO DE MUESTRAS TOMADAS POR CADA SUPERMERCADO

Lugar de Muestreo	N	%
Supermercados A	33	64.7%
Supermercados B	18	35.2%

Elaborado por: Plaza Luis, 2012

Después de analizar 51 muestras de queso provenientes de 6 supermercados ubicados en el Norte de la ciudad de Guayaquil y uno en el cantón Samborondón. Las muestras se tomaron en dos cadenas de supermercados. La cantidad de muestras fueron tomadas de acorde al volumen de queso que consume la población guayaquileña. Los supermercados donde se tomaron las muestras presentaron la siguiente distribución de tipos de quesos que se comercializan en los supermercados donde se tomaron las muestras.

TABLA 7
DISTRIBUCIÓN DE TIPOS DE QESOS QUE SE COMERCIALIZAN EN LOS SUPERMERCADOS

Tipos de Qesos en Percha	N	%
Qesos Frescos	1584	68.71%

Quesos Tipo Mozzarella	299	14.63%
Quesos Maduros	165	7.52%
Otros Tipos de Quesos	120	5.64%

Elaborado por: Plaza Luis, 2012

En los supermercados muestreados se tomó como referencia la cantidad de unidades de quesos presentes en las perchas, cuantificándolos por tipos. En donde fue muy notorio que el tipo de queso con un número mayor de unidades en percha fue el queso de tipo Fresco con 1584 unidades presentes en los siete supermercados muestreados. Se observó variadas marcas para este de tipo de queso.

Sin embargo la variedad de queso tipo Mozzarella fue uno de los tipos, en los que también se evidenció gran número de unidades presentes en las perchas. Siendo de gran aceptación para los consumidores en la ciudad de Guayaquil. El número de unidades cuantificadas para este tipo de queso fue de 299.

También se evidencia los quesos tipo maduros y quesos de otros tipos son poco apetecidos por el consumidor. Encontrando una minoría en referencia a los

quesos del Tipo Fresco. Se contabilizan 165 unidades de quesos Tipo maduros y 120 unidades de Otros Tipos de quesos (Herbales, Parmesano, etc.)

Las presentaciones de los quesos varían, existiendo presentaciones de 125, 250, 350, 500 y 750 gramos. Las presentaciones más comunes para los consumidores son de 350 g y 750 g. El análisis de los empaques de los quesos coincidieron en todos las marcas muestreadas, siendo las bolsas de polietileno el material de empaque y el sellado al vacío.

De otro lado, al analizar los sistemas de almacenamiento de los quesos en los diferentes supermercados muestreados. Se evidencio que se almacena en vitrinas refrigeradas el 17.6%(9/51), y en su gran mayoría en cámaras de refrigeración 84.4% (41/51) y un 0.5% (1/51) a temperatura ambiente, encontrándose una diferencia estadística altamente significativa.

Con relación a los patógenos analizados, se encontró evidencia de *Salmonella spp.* en los quesos analizados 8/51 (13.71%); para el caso de *Listeria*, se lograron detectar 28/51 (52.94%) cepas correspondientes al género *Listeria spp.*

Se tomó lectura de las temperaturas de las perchas al momento de tomar las muestras, evidenciando la temperatura real en el expendio de los quesos. Siendo un dato importante en la supervivencia y/o proliferación de los microorganismos indicadores.

Las temperaturas encontradas en las perchas se tomaron en todos los puntos muestreados. Obteniendo las siguientes lecturas:

En los supermercados A, se tomaron lecturas del termostato de la percha en cada local visitado.

TABLA 8

TEMPERATURAS EN LA PERCHA DE SUPERMERCADOS A

Supermercados A	Temperaturas del Termostato (°C)
Supermercado A1	2,1
Supermercado A2	2,9
Supermercado A3	2,3
Supermercado A4	2,5

Elaborado por: Plaza Luis, 2012

En los supermercados B, se procedió a tomar lecturas de los respectivos termostatos de los locales visitados.

TABLA 9
TEMPERATURAS EN LAS PERCHAS DE SUPERMERCADOS B

Supermercados B	Temperaturas del Termostato (°C)
Supermercado B1	2,1
Supermercado B2	2,9
Supermercado B3	2,3

Elaborado por: Plaza Luis, 2012

➤ **Temperaturas interna de los quesos**

Siendo la temperatura factor importante en el crecimiento, supervivencia y reproducción de los microorganismos indicadores, se establece cual es la temperatura interna utilizando un termómetro bimetálico. Obteniendo lecturas en el interior de los quesos en la percha.

Las lecturas al interior de cada queso fueron tomadas por cada marca de queso (Marca A, Marca B y Marca C), tomadas en todos los locales muestreados de los Supermercados A y Supermercados B.

TABLA 10
TEMPERATURA INTERNA DE LOS QUESOS DE LAS DIFERENTES
MARCAS EN EL SUPERMERCADO A

Marca de Queso/ Supermercados A	Temperaturas Internas de los Quesos (°C)			
	A1	A2	A3	A4
Marca A	12,4	12,8	13,2	12,5
Marca B	13,4	12,9	13,1	13,3
Marca C	11,7	11,6	12,1	11,6

Elaborado por: Plaza Luis, 2012

Las temperaturas encontradas al interior de los quesos en los supermercados A, estuvieron dentro del rango de temperaturas de refrigeración. Sin embargo las temperaturas encontradas en los quesos de la Marca B, se evidenciaron las

temperaturas más altas. Siendo un factor determinante en la proliferación de los microorganismos indicadores.

TABLA 11
TEMPERATURA INTERNA DE LOS QUESOS DE LAS DIFERENTES
MARCAS EN EL SUPERMERCADO B

Marca de Queso/ Supermercados B	Temperaturas Internas de los Quesos (°C)		
	B1	B2	B3
Marca A	13,3	13,9	12,7
Marca B	14,2	13,7	14,1
Marca C	12,8	12,9	12,8

Elaborado por: Plaza Luis, 2012

Las temperaturas encontradas en las muestras tomadas en los Supermercados B, prevalecen rangos de temperaturas muy ajustados a los de refrigeración para este tipo de productos.

También se confirma que los quesos que registran mayor temperatura, son los de la Marca B. El rango general de temperaturas para todas las marcas estuvo muy ajustado a los rangos de temperatura para este tipo de productos.

➤ **pH de los quesos**

Los valores de pH dan un rango de la supervivencia y crecimiento de los microorganismos indicadores, se toman lecturas de los valores en las muestras tomadas.

TABLA 12
PH DE LOS QUESOS FRESCOS DE LAS DIFERENTES MARCAS EN EL
SUPERMERCADO A

Marca de Queso/ Supermercados A	pH en los Quesos			
	A1	A2	A3	A4
Marca A	5.22	5,81	5.88	6.08
Marca B	6.21	6.01	5.88	6.26
Marca C	5.96	5.84	5.62	5.53

Elaborado por: Plaza Luis, 2012

El pH de las muestras tuvo variación entre marcas en los Supermercados tipo A, siendo el queso de la Marca B, de los que se obtuvieron lecturas fuera de parámetros.

Siendo un factor determinante en el crecimiento y proliferación de los Microorganismos en estudio. En donde prima la proliferación en pH cercanos a la neutralidad.

TABLA 13
PH DE LOS QUESOS FRESCOS DE LAS DIFERENTES MARCAS EN EL
SUPERMERCADO B

Marca de Queso/ Supermercados B	pH en los Quesos		
	B1	B2	B3
Marca A	5.36	5.99	6.11
Marca B	6.32	5.88	6.21
Marca C	5.49	5.62	5.74

Elaborado por: Plaza Luis, 2012

- **Características organolépticas de los quesos.**

Con las muestras tomadas se procede a realizar un análisis organoléptico. El cual resalta los atributos de color y de olor. Siendo el propósito el de determinar alguna diferencia organoléptica que afecte en la elección.

TABLA 14
RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL DE QUESOS FRESCOS
(PARÁMETRO COLOR)

EVALUACIÓN SENSORIAL DE QUESOS FRESCOS			
RESULTADOS DEL PARAMETRO DE COLOR			
Marca/ Aceptación	1	0	-1
MARCA A	3	10	17
MARCA B	0	12	18
MARCA B	10	12	8

Elaborado por: Plaza Luis, 2012

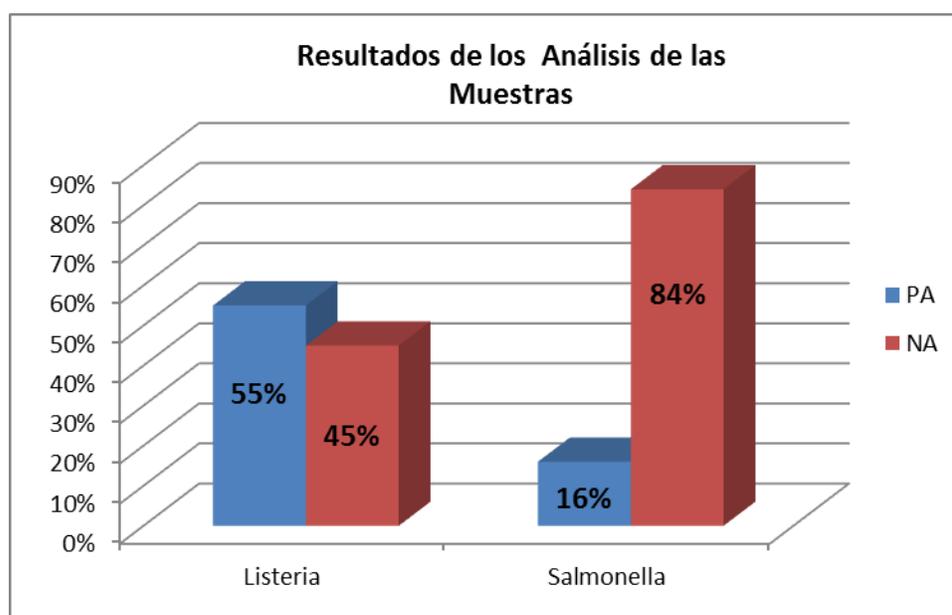
TABLA 14
RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL DE QUESOS FRESCOS
(PARÁMETRO OLOR)

EVALUACIÓN SENSORIAL DE QUESOS FRESCOS			
RESULTADOS DEL PARAMETRO DE OLOR			
Marca/ Aceptación	1	0	-1
MARCA A	3	10	17
MARCA B	0	8	22
MARCA C	13	17	0

Elaborado por: Plaza Luis, 20

3.1 Resultados a través de Pruebas Rápidas de Detección.

El resultado de los análisis refleja la presencia de *Listeria* y *Salmonella* en los quesos muestreados. Sin embargo hay una mayor incidencia de *Listeria*.



Elaborado por: Plaza Luis, 2012

FIGURA 3.1 RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE QUESOS FRESCOS

La grafica evidencia la presencia de *Listeria* en el 55% de las muestras tomadas; mientras para *Salmonella* solo se evidencia un 16% de muestras positivas.

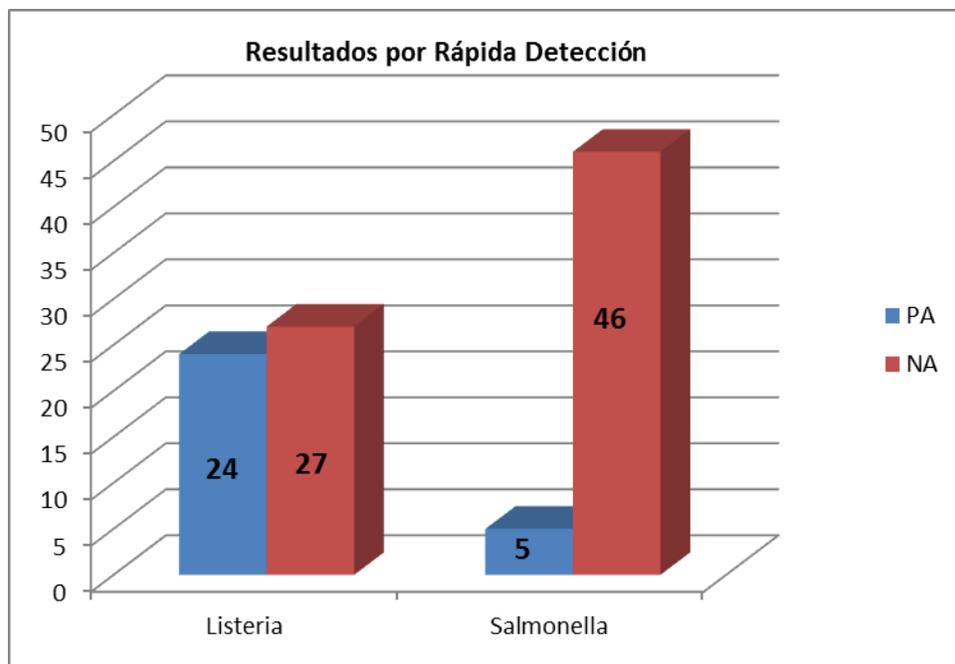
El análisis de las muestras se realizó con dos métodos, en donde se validó un método de rápida detección versus un método tradicional y normado. Dando un enfoque en la concordancia de datos recopilados. Y la aceptación del método de rápida detección.

El ensayo mediante pruebas de rápida detección poseen el mismo procedimiento y principio de los métodos tradicionales; la diferencia radica en el tiempo de la identificación del microorganismo y la versatilidad en el uso de recursos.

Estos métodos son cualitativos. Ya que se basan en un principio de interacción entre antígenos y anticuerpos específicos para cada microorganismo.

Las limitaciones que poseen los métodos utilizados, son las posibles lecturas negativas cuando las muestras contengan concentraciones muy altas de anticuerpos; la cual creara una lectura negativa. Por esto es estricta la comparación por un método tradicional y normado.

Los resultados obtenidos por este método de análisis arrojaron los siguientes resultados:



Elaborado por: Plaza Luis, 2012

FIGURA 3. 2 GRÁFICO DE BARRAS CON LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS POR MÉTODO DE RÁPIDA DETECCION

Los análisis realizados por el método de Rápida Detección determinan la positividad para Listeria en 24 muestras. Y la positividad para Salmonella en 5 de las muestras.

La confiabilidad que declara el fabricante cuenta con un aval de la AOAC con la homologación de un método normado y sus validaciones respectivas.

Para la prueba de *Listeria* esta validado oficialmente por la AOAC como Método OFICIAL N° 993.12. (2000). *Listeria monocytogenes* in Milk and Dairy Products. Selective Enrichment and Isolation Method. Para la prueba de *Salmonella* fue validado oficialmente por la AOAC, siendo el Método Oficial 2002.10. *Salmonella* in Fresh Cheese, Dried Egg Products, and Fresh Chilled and Frozen Poultry

3.1.1 Resultados para *Listeria* por Rápida Detección

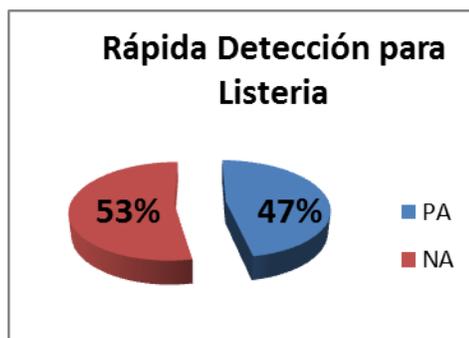
Los resultados de los análisis realizados arrojan una incidencia mayor en la presencia de *Listeria*, mientras que para *Listeria* no se presentan datos que aseveren la presencia entre la población. Se obtienen 24 análisis positivos de 51 muestras analizadas.



Elaborado por: Plaza Luis, 2012

FIGURA 3. 3 ANÁLISIS POSITIVOS PARA *LISTERIA* EN QUESOS FRESCOS POR MÉTODO DE RÁPIDA DETECCIÓN

En cuanto a la incidencia de esta bacteria en la salud de la población; solo se reportan posibles casos que no se basan en experimentación científica solo son reportes con supuestos.



Elaborado por: Plaza Luis, 2012

FIGURA 3.4 GRÁFICO CIRCULAR CON LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS POR MÉTODO DE RÁPIDA DETECCIÓN PARA *LISTERIA*

3.1.2. Resultados para *Salmonella* por Rápida Detección

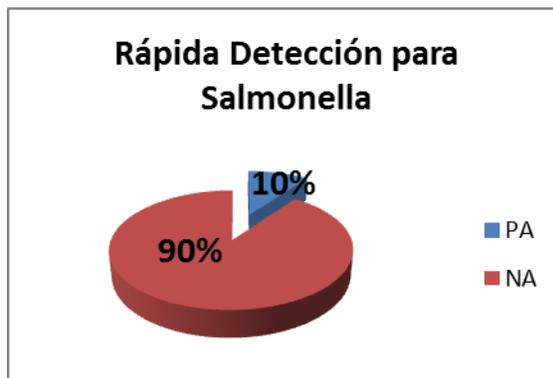
En los análisis realizados la presencia para *Salmonella* es de menor incidencia. Evidenciando 5 muestras positivas de 51 muestras analizadas.



Elaborado por: Plaza Luis, 2012

FIGURA 3.5 ANÁLISIS POSITIVOS PARA *SALMONELLA* EN QUESOS FRESCOS POR MÉTODO DE RÁPIDA DETECCIÓN

Para esta bacteria se poseen datos e incidencia en la salud de la población. Pero no se cuantifican con exactitud de ser causantes de posibles ETA's en nuestro país.



Elaborado por: Plaza Luis, 2012

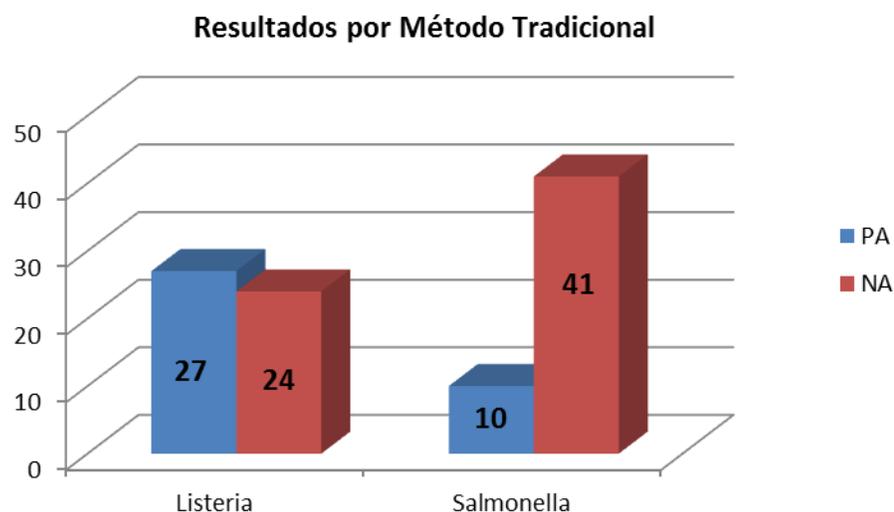
FIGURA 3.6 GRÁFICO CIRCULAR CON LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS POR MÉTODO DE RÁPIDA DETECCION PARA SALMONELLA

3.2 Resultados a través de Métodos Convencionales

El método convencional o tradicional da la pauta, siendo un confirmativo en la presencia o ausencia de los microorganismos en cuestión. Al ser normados tienen la veracidad de sus procedimientos, aunque lleven mucho tiempo versus las pruebas de rápida detección. Pudiendo cuantificar el número de colonias existentes en la muestra de análisis.

La utilización de medios selectivos y altamente selectivos, crean un margen de error mínimo para que se pueda encontrar otra especie en dichos medios. Dando certeza de los datos que se obtienen a partir de estos análisis.

La experimentación se realizó tomando en referencia la Norma Técnica Colombiana NTC-4666 para la detección de Listeria, esta norma fue considerada por la carencia de una norma dentro de la normativa ecuatoriana. Mientras que la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529 -15:2009 fue la referencia en la detección de Salmonella.



Elaborado por: Plaza Luis, 2012

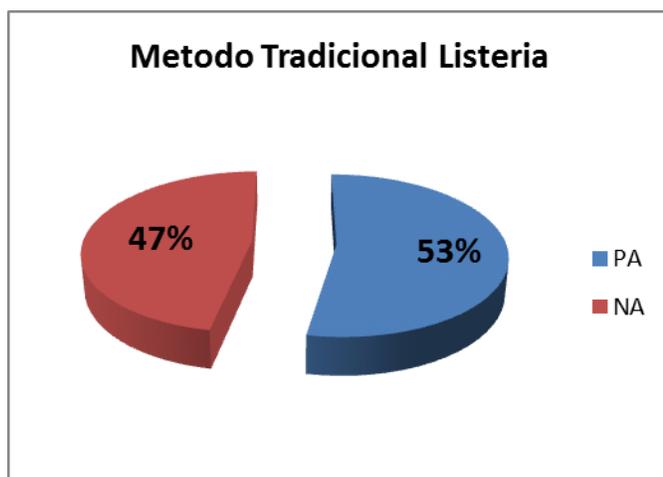
**FIGURA 3.7 GRÁFICO DE BARRAS CON LOS RESULTADOS DE
LOS ANÁLISIS POR MÉTODO TRADICIONAL**

Los resultados por el método tradicional ratifica la supremacía en la presencia de *Listeria* en las muestras, aunque la presencia para *Salmonella* es evidenciable en menor cantidad.

De las 51 muestras analizadas por el método tradicional para *Listeria*, en los análisis se detectaron positivos en 27 muestras. Mientras que para *Salmonella* se detectaron 10 muestras positivas.

3.2.1 Resultados para *Listeria* por Método Tradicional

Los análisis realizados a las muestras dieron como resultado 27 muestras de las 51 muestras posibles. Estas muestras fueron tomadas de la misma matriz de las muestras tomadas para realizar el análisis por Rápida Detección.

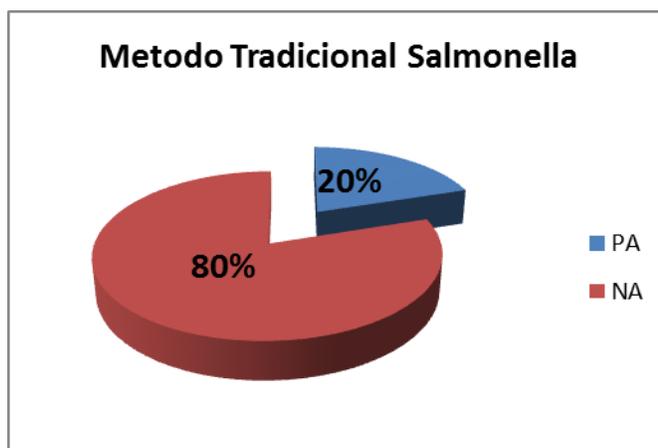


Elaborado por: Plaza Luis, 2012

FIGURA 3.8 GRÁFICO CIRCULAR CON LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS POR MÉTODO TRADICIONAL PARA *LISTERIA*

3.2.2 Resultados para Salmonella por Método Tradicional

Se realizaron los ensayos para determinación de presencia o ausencia; realizada la siembra obtienen 10 muestras con presencia de Salmonella entre las 51 muestras analizadas.



Elaborado por: Plaza Luis, 2012

FIGURA 3.9 GRÁFICO CIRCULAR CON LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS POR MÉTODO TRADICIONAL PARA *SALMONELLA*

3.3 Homologación de las Pruebas Rápidas y los Métodos convencionales.

Para validar los resultados obtenidos, es necesario comparar los datos obtenidos con las pruebas rápidas y validarlos con un método convencional normado. Descartando Falsos positivos o Falsos Negativos. Siendo también una prueba para medir la eficacia y confiabilidad de las pruebas rápidas.

Fue necesario realizar las pruebas por duplicado partiendo de las mismas muestras en simultáneo, obteniendo resultados para la respectiva comparación de las muestras.

Se midió el nivel de concordancia entre los dos métodos usados para la detección de *Listeria* y *Salmonella*. Se cuantifica el número de muestras analizadas por cada marca, se dan los resultados positivos y negativos. Con los resultados obtenidos por el método tradicional se confirman o se descartan los resultados obtenidos por el método de rápida detección.

Se realiza la verificación de la concordancia clasificando resultados en Falsos Negativos (FN) para análisis que dieron negativos por el método de rápida detección y positivos en el método tradicional. Mientras que los Falsos Positivos (FP) son para los análisis que dieron positivos por el método de rápida detección y negativos en el método tradicional.

El nivel de concordancia entre los métodos utilizados se verifica hallando el índice de Kappa. Ya que la precisión en la utilización de un método o procedimiento se ve afectada factores fundamentales: la variación propia del método utilizado o procedimiento y experiencia del analista. La variación del método de Rápida Detección fue comparada,

con pruebas estándar y normadas, midiendo la concordancia alcanzada al analizar y clasificar las muestras por marcas

Sin embargo, para tener veracidad en los resultados de los análisis. Además de comprobar que en la metodología utilizada se obtuvieron resultados reales, se los compararon con un ente patrón. Siendo un laboratorio acreditado por la OAE el encargado de ratificar los resultados obtenidos.

3.3.1 Homologación de Las Pruebas para *Listeria*.

Se realiza una comparación entre los métodos utilizados para la detección de *Listeria* en quesos frescos. Donde se describen el número de muestras tomadas por cada marca de queso(N). El número de análisis positivos en los dos métodos (PA). El número de Análisis Negativos para en los dos métodos (NA). Se verifica el número de muestras positivas en el método tradicional y negativas en el método de rápida detección (FN) y el número de muestras negativas en el método tradicional y positivo en el método de rápida detección (FP).

Se determina la Efectividad relativa (AC) que mide el grado de correspondencia entre las respuestas obtenidas por los métodos de referencia y alternativo en muestras idénticas. La Especificidad Relativa (SP) tiene la habilidad del método de rápida detección cualitativo de detectar el analito cuando no es detectado por el método de referencia.

Finalmente el índice de Kappa que determina el nivel de concordancia entre los dos métodos.

En la tabla 15, se describe los resultados en positivos y negativos y las comparaciones de falsos positivos y falsos negativos. Validando los resultados por el método de rápida detección.

TABLA 16
RESULTADOS OBTENIDOS EN LA COMPARACIÓN POR MÉTODO RÁPIDO Y
CONVENCIONAL PARA LISTERIA EN QUESOS FRESCOS (SAMBORONDÓN)

Muestras	N° de Muestras						% Evaluado		K ^e
	<i>N</i>	<i>PA</i>	<i>NA</i>	<i>FN</i>	<i>FP</i>	<i>AC</i>	<i>SP</i>		
Marca A	17	13	4	0	0	100	100	1.00	
Marca B	17	11	2	4	0	76	76	0.87	
Marca C	17	0	17	0	0	100	100	1.00	
Total	51	24	23	4	0	92	92	0.91	
<p>a. PA: Positivas, NA: Negativas, FN: Falso Negativos, FP: Falsos Positivos, AC: Efectividad Relativa, SP: Efectividad Relativa, N= PA+ FN+FP</p> <p>b. Estos resultados se dan después de la confirmación.</p> <p>c. Estas matrices son definidas por la norma NORDVAL. Donde se hizo una comparación trial de marcas de quesos frescos</p> <p>d. El índice de Cohen's Kappa se calculó de acuerdo al procedimiento NMKL N° 20.</p>									

Elaborado por: Plaza Luis, 2012

3.3.2 Homologación de Las Pruebas para *Salmonella*.

Se realiza una comparación entre los métodos utilizados para la detección de *Listeria* en quesos frescos. Donde se describen el número de muestras tomadas por cada marca de queso(N). El número de análisis positivos en los dos métodos (PA). El número de Análisis Negativos para en los dos métodos (NA). Se verifica el número de muestras positivas en el método tradicional y negativas en el método de rápida detección (FN) y el número de muestras negativas en el método tradicional y siendo positivas en el método de rápida detección (FP).

Se determina la Efectividad relativa (AC) que mide el grado de correspondencia entre las respuestas obtenidas por los métodos de referencia y alternativo en muestras idénticas. La Especificidad Relativa (SP) tiene la habilidad del método de rápida detección cualitativo de detectar el analito cuando no es detectado por el método de referencia.

Finalmente el índice de Kappa que determina el nivel de concordancia entre los dos métodos.

TABLA 17
RESULTADOS OBTENIDOS EN LA COMPARACIÓN POR MÉTODO RÁPIDO Y
CONVENCIONAL PARA *SALMONELLA* EN QUESOS FRESCOS (GUAYAQUIL)

Muestras	N° de Muestras						% Evaluado		K ^e
	<i>N</i>	<i>PA</i>	<i>NA</i>	<i>FN</i>	<i>FP</i>	<i>AC</i>	<i>SP</i>		
Marca A	17	2	15	0	0	100	100	1.00	
Marca B	17	3	9	5	0	71	71	0.9	
Marca C	17	0	17	0	0	100	100	1.00	
Total	51	5	41	5	0	90	90	0.81	

a. PA: Positivas, NA: Negativas, FN: Falso Negativos, FP: Falsos Positivos, AC: Efectividad Relativa, SP: Efectividad Relativa, N= PA+ FN+FP
b. Estos resultados se dan después de la confirmación.
c. Estas matrices son definidas por la norma NORDVAL. Donde se hizo una comparación trial de marcas de quesos frescos
d. El índice de Cohen´s Kappa se calculó de acuerdo al procedimiento NMKL N° 20.

Elaborado por: Plaza Luis, 2012

3.4 Análisis Estadístico

Con la obtención de los resultados de los análisis se evalúan las posibles causales en la incidencia de *Listeria spp.*, y *Salmonella spp.*, en las muestras analizadas. Se plantean si hay diferencias entre los métodos de análisis, si las marcas de quesos muestreadas inciden en la presencia de los microorganismos, y si existe incidencia estadística en los quesos con diferentes temperaturas en su almacenamiento.

Después de haber realizado un análisis de concordancia entre los métodos utilizados para la detección de *Listeria spp.*, y *Salmonella* determinando una concordancia muy alta. Es necesario determinar estadísticamente si las hipótesis establecidas en base a criterios técnicos, llegando a la conclusión de su validez o no con la evidencia de los datos obtenidos.

Se evaluó mediante una prueba pareada en Minitab si existe una diferencia estadística entre los métodos utilizados para la detección de los patógenos indicadores. Encontrando una diferencia estadística significativa, con un valor $p= 0.659$, razón suficiente para descartar que los métodos utilizados sean diferentes.

Se establece que la incidencia de *Listeria* y *Salmonella* están asociada a las condiciones de expendio de los quesos frescos encontrando mayor incidencia en los Supermercados de la cadena B con una evidencia estadística ($p=0.03$) que da validez a la influencia en las cadenas de supermercados.

Ligado a este análisis se evalúan que las temperaturas de refrigeración en las perchas eran diferentes, se evaluaron estadísticamente el parámetro de temperatura. Encontrando que hay una evidencia estadística ($p=0.02$) que indica la influencia de la temperatura de almacenamiento en las perchas incide en la presencia de los microorganismos.

Con los datos encontrados se establece como hipótesis que las marcas de quesos frescos seleccionadas son incidencia directa en la presencia o ausencia de *Listeria* y *Salmonella* en las muestras analizadas obteniendo suficiente evidencia estadística ($p=0.003$) para concluir que las marcas de quesos seleccionada tienen incidencia en la presencia de *Listeria spp.*

Mientras que para *Salmonella spp.* no hay la suficiente evidencia ($p=0.368$) para determinar que las marcas de quesos seleccionados son incidencia en la presencia. Al realizar estos análisis se observaron hallazgos que normalmente no se logran en este tipo de estudios por falta de evidencia documentada, por lo tanto, se hace énfasis de los hallazgos más importantes que se encontraron en este estudio.

3.5 Análisis de la Normativa para quesos frescos

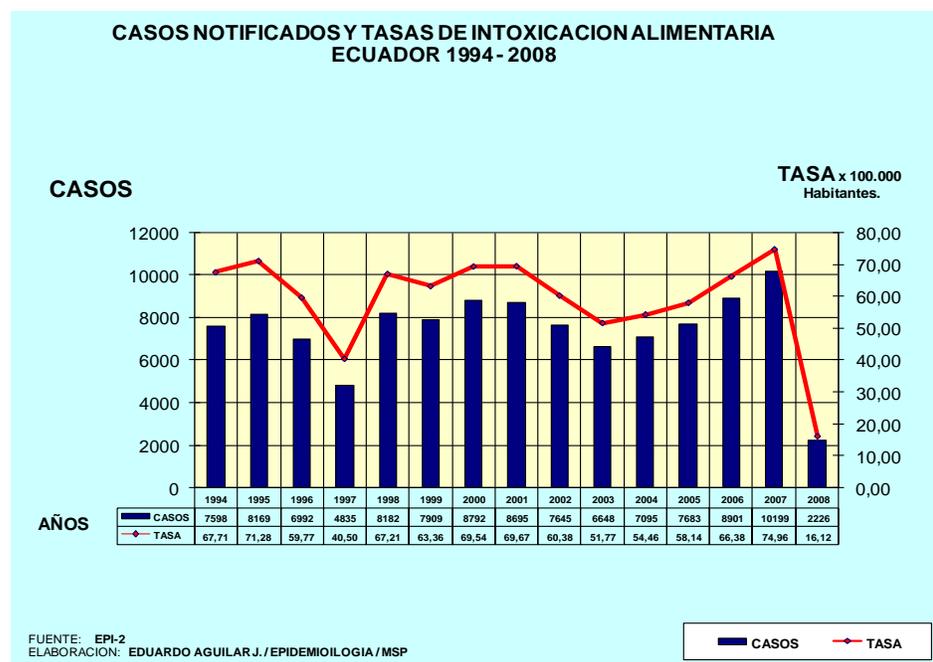
Los requerimientos microbiológicos para los quesos frescos según la especificación de la norma técnica ecuatoriana NTE INEN 1528. Tiene tolerancia para microorganismos patógenos como *E. coli* y *S. aureus*. Pero no acepta la presencia de *Salmonella*.

El vacío legal de la norma no se refiere a microorganismos del genero *Listeria*. Solo cita un párrafo donde describe que deberá estar exento de otros microorganismos patógenos.

En ninguna parte de la norma se describe la presencia o ausencia de *Listeria*, se debe interpretar la norma y no liberar quesos que den positivos para *Listeria*, ya que siendo un patógeno no se estaría

cumpliendo con la inocuidad del alimento. Además nuestra norma no posee un procedimiento para la detección.

Al no contar con una norma que permita su identificación, aislamiento y cuantificación. No es considerada para análisis en la elaboración de quesos, así también no es vinculada a ser un causal en la salud pública.



Fuente: EPI-2

**FIGURA 3.10 CASOS NOTIFICADOS Y TASA DE INTOXICACIÓN
ALIMENTARIA EN ECUADOR**

En la figura 3.10 se muestra que las intoxicaciones no son representativas, ya que la cultura de nuestro medio carece de la costumbre de denunciar y notificar. Solo se registran los casos con un gran número de afectados.

En el caso de *Salmonella* no se permite la presencia de este microorganismo en los quesos frescos. Ya que esta bacteria tiene incidencia directa con la salud pública. La norma de quesos frescos NTE INEN 1528 declara que debe estar ausente, además posee un método para la detección norma técnica ecuatoriana NTE INEN 1529: 15: 2009.

De esta bacteria se poseen estadísticas acerca de la incidencia y número de casos desde 1990 hasta el año 2008. Donde se aprecia la gráfica una gran disminución de casos en últimos 5 años. Esto se debe a un poco más de conocimientos e implementación de normas que promueven la inocuidad del alimento.

Sin embargo, estos cuadros se presentan con mucha frecuencia en nuestro medio. Siendo muy propensos los chicos en edades escolares.

Se realiza una experimentación en las muestras tomadas después del análisis para los patógenos indicadores. Se realiza este análisis con el afán de comparar sus parámetros reales frente al marco legal que se rigen, se realiza para cada una de las marcas muestreadas.

Se realiza un compost de las muestras por marca ya que solo se desea analizar por marca si cumplen con los límites microbiológicos estipulados en la norma para quesos frescos. Se realizan los análisis de *E.coli* comparándolos con el límite que define la norma, expresando los resultados en la siguiente tabla:

TABLA 18
RESULTADO DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE *E. COLI* EN LAS
MARCAS DE QUESOS MUESTREADOS

Muestra	Resultado (NMP/g)	Norma (NMP/g)
Marca A	>1100	Ausencia
Marca B	>1100	Ausencia
Marca C	19	Ausencia

Elaborado por: Plaza Luis, 2012

Los análisis reflejan que en la Marca A y B en la lectura del Numero Más Probable (NMP) presentan altas cargas de microorganismos viables pero no se detectó presencia de *E.coli* mientras en la Marca C la carga de células viables fue tan solo de 19 marcando una ausencia.

TABLA 19
RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE *S. AUREUS*
EN LAS MARCAS DE QUESOS MUESTREADOS

Muestras	Resultado (UFC/g)	Norma (UFC/g)
Marca A	3.4×10^2	100
Marca B	3.7×10^2	100
Marca C	3.4×10^2	100

Elaborado por: Plaza Luis, 2012

Para los análisis de *S. aureus* se presentó valores por encima de los límites permitidos en las marcas A y B, mientras la Marca C reporto valores dentro de los parámetros.

TABLA 20
RESULTADOS DEL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE MOHOS Y
LEVADURAS EN LAS MARCAS DE QUESOS MUESTREADOS

Muestras	Resultado (UPC/g)	Norma (UPC/g)
Marca A	10	5×10^4
Marca B	10	5×10^4
Marca C	10	5×10^4

Elaborado por: Plaza Luis, 2012

En análisis para hongos se presentaron todos los valores muy por debajo de los rangos permitidos en todas las marcas de quesos muestreados.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados se concluye lo siguiente:

- Se logra evidenciar la presencia de microorganismos patógenos como *Listeria* y *Salmonella* en los quesos frescos muestreados en los supermercados de mayor concurrencia en la ciudad de Guayaquil, obteniendo resultados a partir de métodos de rápida detección y su posterior validación con métodos tradicionales por un Laboratorio acreditado.

- Debido a que las normas ecuatorianas establecidas para quesos frescos no plantean especificaciones para *Listeria*, las referencias para este microorganismo fueron tomadas de las normas técnicas colombianas NTC-4666 y según datos proporcionados por el Ministerio de Salud no se han notificado casos confirmados de listeriosis, el factor común en estos casos han sido la intoxicación con productos lácteos, de mayor incidencia como el quesos.
Siendo el sector vulnerable los niños, ancianos, mujeres embarazadas y personas inmunodeprimidas.
- Se estableció que la incidencia de *Listeria spp.* en quesos frescos que se expenden en supermercados de Guayaquil fue del 55%. Sin embargo, en las mismas muestras no se detectó presencia de *Salmonella spp.*; posiblemente por condiciones de stress nutricional y ácidos orgánicos en los quesos muestreados.
- En cuanto a los quesos frescos contaminados, existen diferencias significativas en función a su origen, encontrándose más casos por *Listeria spp.* en aquellos productos procedentes de los supermercados de la cadena B.

- La confiabilidad de los resultados obtenidos mediante métodos de rápida detección es elevada, obteniendo un valor de 0.9 en el índice de Cohen's Kappa, además de presentar ventajas para la industria debido a los tiempos empleados para la obtención de resultados, siendo estos más rápidos.
- El desafío para la industria alimentaria es mantener alejados a los microorganismos patógenos de los lugares donde se procesan o almacenan alimentos listos para el consumo. Para ello, deben tenerse implementados rigurosos programas de limpieza y sanitización y utilizar higienizantes o biocontroladores capaces de eliminar a los patógenos, incluso cuando éstos forman biofilm.

También, se deben implementar sistemas eficaces para el aseguramiento de la inocuidad, independientemente del tamaño de la empresa.
- Una forma de controlar la contaminación del producto en proceso en las plantas procesadoras es con la validación de los métodos de limpieza de las superficies en contacto con los alimentos, pudiendo determinar malas operaciones de limpieza con validaciones periódicas que indiquen que son causa de contaminación en el producto terminado.

- Los resultados de la validación de las pruebas microbiológicas realizadas determinan la presencia de *Listeria* en la MARCA “A” y la MARCA “B” mientras que en la MARCA “C” no se reportaron presencia ni para *Salmonella* ni para *Listeria*.

Estos resultados reflejan que en dos de las marcas existe una carencia en la aplicación de temas dirigidos a la inocuidad como las buenas prácticas en la manufactura y/o la verificación del cumplimiento de los programas que controlan el acopio de materias primas, producción, manipulación, almacenamiento y transporte. Cubriendo los diferentes eslabones de la cadena alimentaria.

- La interpretación de los resultados microbiológicos se realiza en base a la norma INEN NTE 1528 para quesos fresco evidenciándose que la MARCA “A” está fuera de las especificaciones por reportar presencia de *E. coli*, mientras la MARCA “B” reportó un valor de 3.7×10^2 UFC/g para *S. aureus* encontrándose dentro de los parámetros permitidos y para la MARCA “C” no se reportó patógenos.
- En cuanto a la interpretación de los resultados organolépticos fue unánime por el número de panelista participantes en la elección por el

queso de la MARCA “C”, ya que su color era blanco marfil y su olor no fue penetrante en relación a los demás quesos, debido a que las caseínas no estaban en estado de descomposición.

- En la elección del método de detección de los microorganismos, el método más práctico y de bajo costo, sin duda alguna, son los métodos de rápida detección, debido a que no requieren muchos equipos de laboratorio que ocupen espacio y tiene una alta confiabilidad frente a otros métodos.
- Posteriormente a la homologación de los resultados por cada metodología utilizada, se realizó la comparación con un laboratorio externo acreditado. Por lo que es suma importancia ver las variaciones entre los métodos y la sensibilidad que declaran los métodos de rápida detección.
- Dada la sensibilidad y rapidez para la obtención de resultados mediante el método de rápida detección, es factible utilizar este método como único para la detección de *Salmonella* y *Listeria*, dado que se encuentra validado por la AOAC ,dejando como pruebas confirmatorias a los métodos tradicionales y seleccionando solamente aquellas muestras de

las cuales se sospechan que podrían reportar presencia de estos microorganismos, pudiendo repercutir en la optimización de tiempo y recursos para la obtención de resultados y toma de decisiones.

- Es importante que el consumidor respete la cadena de frío como medio de conservación de los quesos frescos, ayudando así a reducir el riesgo de contraer enfermedades de transmisión alimentaria, teniendo en cuenta a grupos vulnerables a posibles intoxicaciones por el consumo de alimentos de alto riesgo.
- Se recomienda extender el análisis de los quesos frescos hacia los productores para determinar cuáles son los puntos críticos en la contaminación de los quesos frescos durante la producción de los mismos. Debiendo validar la efectividad de los tratamientos térmicos en función de los patógenos más termo resistentes.
- Con este estudio se deja un precedente de la presencia de patógenos en quesos frescos en los supermercados de Guayaquil, por lo que se recomienda que se sigan desarrollando estudios en más supermercados y tiendas de diferentes ciudades, aumentando el

tamaño muestral que establezcan la incidencia en la salud de la población a nivel nacional.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

TABLA DE VALORES TOMADOS DE LA MILITARY STANDAR MI14TD-1050

TABLE I—Sample size code letters

(See 9.2 and 9.3)

Lot or batch size	Special inspection levels				General inspection levels		
	S-1	S-2	S-3	S-4	I	II	III
2 to 8	A	A	A	A	A	A	B
9 to 15	A	A	A	A	A	B	C
16 to 25	A	A	B	B	B	C	D
26 to 50	A	B	B	C	C	D	E
51 to 90	B	B	C	C	C	E	F
91 to 150	B	B	C	D	D	F	G
151 to 280	B	C	D	E	E	G	H
281 to 500	B	C	D	E	F	H	J
501 to 1200	C	C	E	F	G	J	K
1201 to 3200	C	D	E	G	H	K	L
3201 to 10000	C	D	F	G	J	L	M
10001 to 35000	C	D	F	H	K	M	N
35001 to 150000	D	E	G	J	L	N	P
150001 to 500000	D	E	G	J	M	P	Q
500001 and over	D	E	H	K	N	Q	R

**TABLA DE VALORES TOMADOS DE LA MILITARY STANDAR MI14TD-1050
PARA LA DETERMINACIÓN
DEL SECTOR MUESTRAL EN SUPERMERCADOS**

Tamaño de lote (Cadenas de Supermercados)	Número de Cadenas de Supermercados a muestrear	Nivel de Inspección
2 a 8	2	II Normal
9 a 15	3	II Normal
16 a 25	5	II Normal
26 a 50	8	II Normal
51 a 90	13	II Normal
91 a 150	20	II Normal

**TABLA DE VALORES TOMADOS DE LA MILITARY STANDAR MI14TD-1050 PARA
LA DETERMINACIÓN
DEL SECTOR MUESTRAL DE MARCAS DE QUESOS FRESCOS**

Tamaño de lote (Marcas de quesos frescos)	Número de Marcas de Quesos frescos a muestrear	Nivel de Inspección
2 a 8	2	II Normal
9 a 15	3	II Normal
16 a 25	5	II Normal
26 a 50	8	II Normal
51 a 90	13	II Normal
91 a 150	20	II Normal

**TABLA DE VALORES TOMADOS DE LA MILITARY STANDAR MI14TD-1050
PARA LA DETERMINACIÓN
DEL SECTOR MUESTRAL EN UNIDADES DE QUESOS FRESCOS**

Tamaño de lote (Muestras a Tomar)	Número de Muestras a Tomar	Nivel de Inspección
2 a 8	2	II Normal
9 a 15	3	II Normal
16 a 25	5	II Normal
26 a 50	8	II Normal
51 a 90	13	II Normal
91 a 150	20	II Normal
151 a 280	24	II Normal
281 a 500	32	II Normal
501 a 1200	50	II Normal

APÉNDICE 2

CUESTIONARIO PARA LAS PRUEBAS SENSORIALES

Prueba Sensorial de Quesos Frescos			
Producto:		Fecha:	
Indique que tanto le gustan o disgustan las muestras, según la escala:			
	Descripción		Valor
	Me gusta		1
	Ni me gusta ni me disgusta		0
	Me disgusta		-1
Asigne la calificación correspondiente a cada propiedad			
	Muestra 582	Muestra 354	Muestra 149
Olor			
Color			
Observaciones:			

**RESULTADOS DE EVALUACIÓN SENSORIAL DE LAS MUESTRAS
DE QUESOS FRESCOS SEGÚN SU ASPECTO: COLOR**

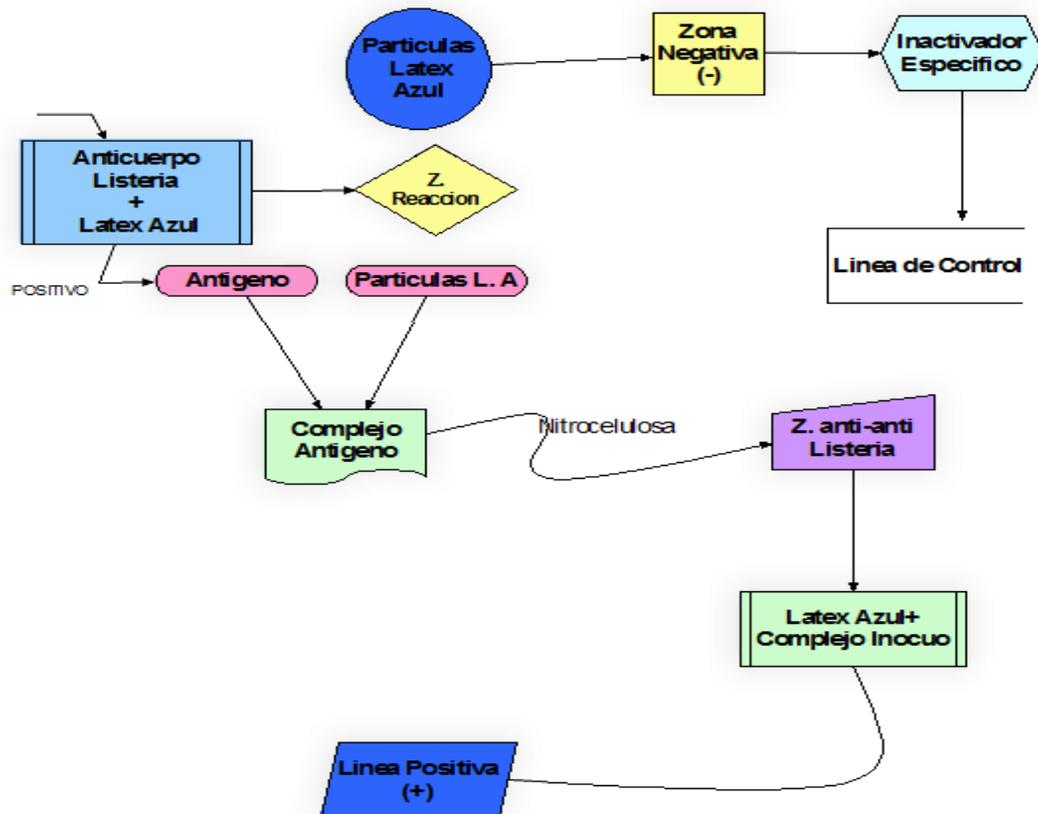
EVALUACION SENSORIAL DE QUESOS FRESCOS									
PARAMETRO COLOR									
CATADORES	MARCA A			MARCA B			MARCA C		
	1	0	-1	1	0	-1	1	0	-1
1			1			1		1	
2			1		1			1	
3			1		1		1		
4		1				1	1		
5	1					1			1
6		1				1			1
7			1		1		1		
8			1			1		1	
9			1		1		1		
10		1				1		1	
11			1			1		1	
12			1		1			1	
13			1		1				1
14			1			1	1		
15			1			1			1
16		1			1			1	
17			1			1	1		
18		1				1		1	
19		1				1	1		
20			1			1	1		
21		1				1			1
22		1				1	1		
23		1			1		1		
24			1		1				1
25			1		1				1
26		1			1				1
27	1					1		1	
28			1			1		1	
29	1				1			1	
30			1			1		1	
TOTAL	3	10	17	0	12	18	10	12	8

**RESULTADOS DE EVALUACIÓN SENSORIAL DE LAS MUESTRAS
DE QUESOS FRESCOS SEGÚN SU ASPECTO: OLOR**

EVALUACION SENSORIAL DE QUESOS FRESCOS									
PARAMETRO OLOR									
CATADORES	MARCA A			MARCA B			MARCA C		
	1	0	-1	1	0	-1	1	0	-1
1			1			1		1	
2			1			1		1	
3			1			1	1		
4		1				1	1		
5	1					1		1	
6		1				1		1	
7			1		1		1		
8			1			1		1	
9			1		1		1		
10		1				1		1	
11			1			1		1	
12			1		1			1	
13			1		1		1		
14			1			1	1		
15			1			1	1		
16		1			1			1	
17			1			1	1		
18		1				1		1	
19		1				1	1		
20			1			1	1		
21		1				1	1		
22		1				1	1		
23		1				1	1		
24			1		1			1	
25			1		1			1	
26		1				1		1	
27	1					1		1	
28			1			1		1	
29	1				1			1	
30			1			1		1	
TOTAL	3	10	17	0	8	22	13	17	0

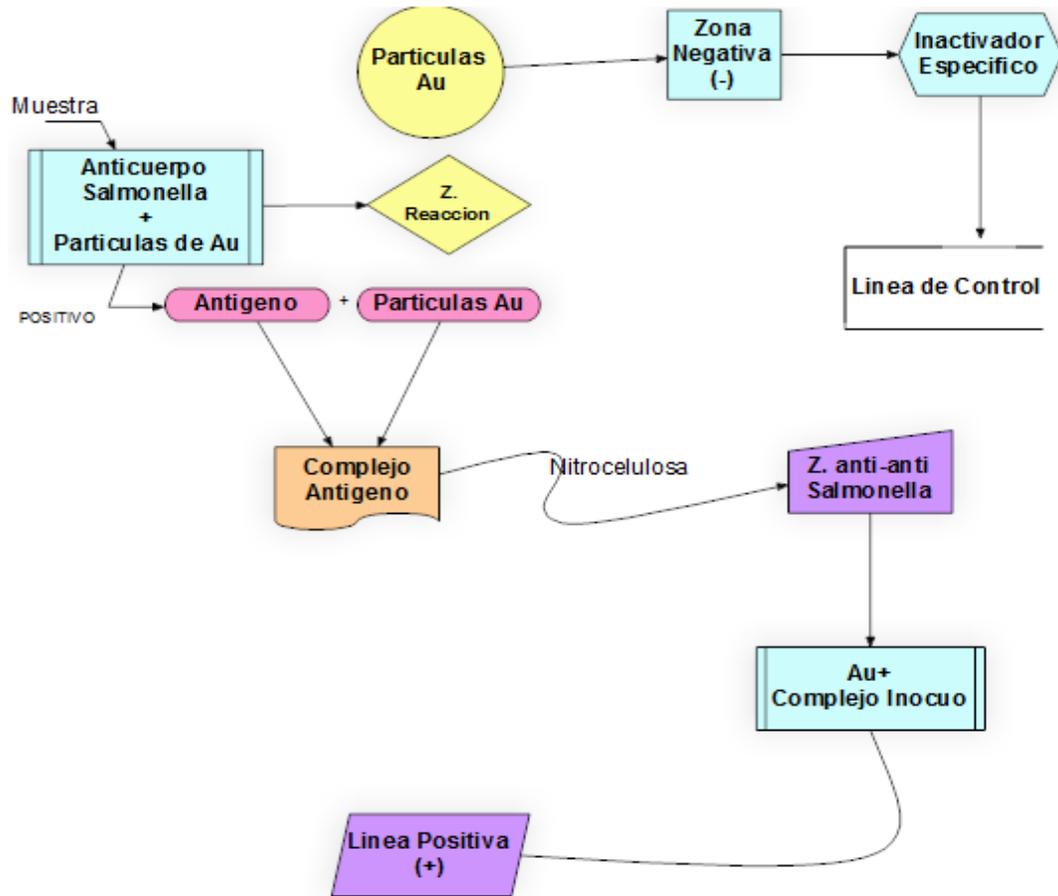
APÉNDICE 3

FUNCIONAMIENTO DEL KIT PARA *LISTERIA*



APÉNDICE 4

FUNCIONAMIENTO DEL KIT PARA SALMONELLA



APÉNDICE 5

ANÁLISIS DEL ÍNDICE DE KAPPA PARA MEDIR LA CONCORDANCIA

- **LISTERIA**

06/06/2012 11:32:30

Estadísticas tabuladas: LA trad. LA kit

Filas: LA trad Columnas: LA kit

	0	1	Todo
0	3 25,00	0 0,00	3 25,00
1	1 8,33	8 66,67	9 75,00
Todo	4 33,33	8 66,67	12 100,00

Contenido de la celda: Conteo
% del total

Kappa 0,8

Estadísticas tabuladas: LB trad. LB kit

Filas: LB trad Columnas: LB kit

	0	1	Todo
0	6 50,00	1 8,33	7 58,33
1	0 0,00	5 41,67	5 41,67
Todo	6 50,00	6 50,00	12 100,00

Contenido de la celda: Conteo
% del total

Kappa 0,833333

Estadísticas tabuladas: LC trad. LC KIT

Filas: LC trad Columnas: LC KIT

	0	Todo
0	12 100	12 100
Todo	12 100	12 100

Contenido de la celda: Conteo
 % del total

Kappa 1

- **SALMONELLA**

Estadísticas tabuladas: SA trad. SA kit

Filas: SA trad Columnas: SA kit

	0	Todo
0	12 100	12 100
Todo	12 100	12 100

Contenido de la celda: Conteo
 % del total

Kappa 1

Estadísticas tabuladas: SB trad. SB kit

Filas: SB trad Columnas: SB kit

	0	1	Todo
0	11 91,67	1 8,33	12 100,00
Todo	11 91,67	1 8,33	12 100,00

Contenido de la celda: Conteo
 % del total

Kappa 0,94

Estadísticas tabuladas: SC trad. SC kit

Filas: SC trad Columnas: SC kit

	0	Todo
0	12 100	12 100
Todo	12 100	12 100

Contenido de la celda: Conteo
 % del total

Kappa 1

**ANALISIS DEL ÍNDICE DE KAPPA PARA MEDIR LA
CONCORDANCIA ENTRE LOS MÉTODOS RÁPIDOS Y
TRADICIONALES**

Estadísticas tabuladas: kit. tradicional

Filas: kit Columnas: tradicional

	0	1	Todo
0	21 41,18	3 5,88	24 47,06
1	2 3,92	25 49,02	27 52,94
Todo	23 45,10	28 54,90	51 100,00

Contenido de la celda: Conteo
 % del total

Kappa 0,802784

APÉNDICE 6

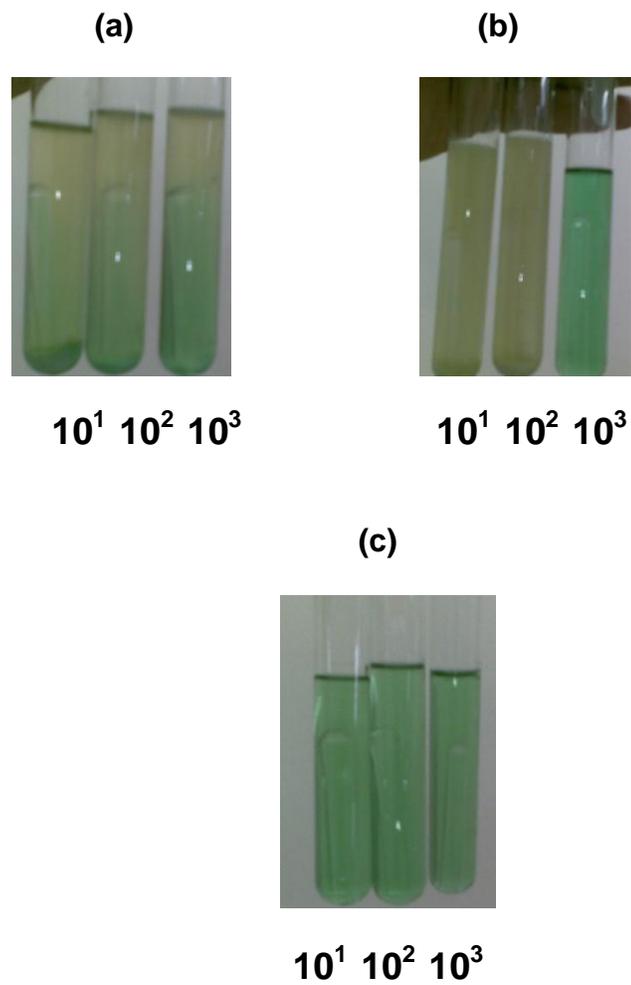


FIGURA 3.12 TUBOS DE VERDE BRILLA DE LAS MUESTRAS DE QUESOS DE (A) MARCA A (B) MARCA B Y (C) MARCA C



FIGURA 3.13 TUBOS DE AGUA DE TRIPTONA CON INDOL POSITIVO PARA LA MUESTRA DE QUESO DE MARCA "B"

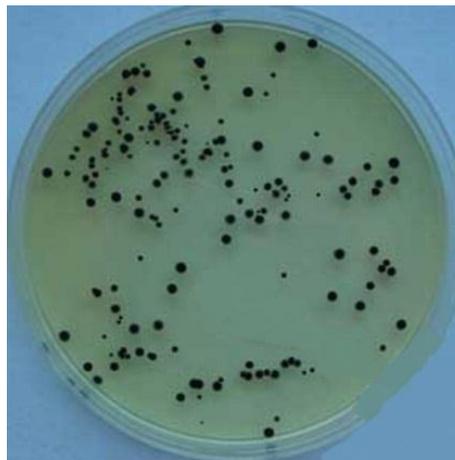


FIGURA 3.14 PLACA CON EL CRECIMIENTO DE *S. AUREUS* DE LA MUESTRA DE QUESO DE MARCA "B"

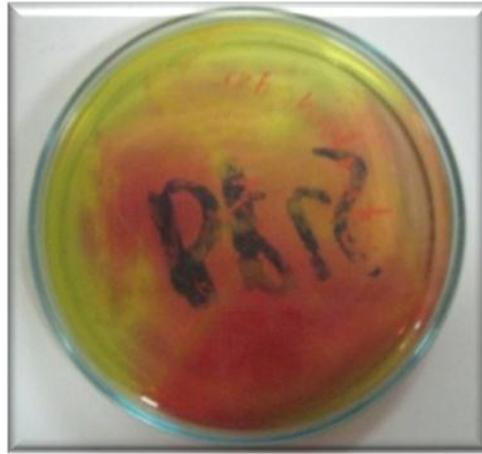


FIGURA 3.15 AUSENCIA DE *SALMONELLA* EN PLACA PARA LA MUESTRA DE QUESO DE MARCA "A"



FIGURA 3.16 PRESENCIA DE *SALMONELLA* EN PLACA PARA LA MUESTRA DE QUESO DE MARCA "B"



FIGURA 3.17 PRESENCIA DE *LISTERIA* EN PLACAS PARA LAS MUESTRAS DE QUESOS DE MARCA “A” y “B”

APÉNDICE 7

VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS FINALES POR LABORATORIOS AVE



INFORME DE ENSAYOS

Fecha de Informe:	27/Jun/2012	N° de Informe:	3043-12	Página:	1/1
-------------------	-------------	----------------	---------	---------	-----

INFORMACION DEL CLIENTE:					
Nombre:	JIPRA, OH S.A.				
Dirección:	Av. Séptima s/n entre calle 14 y 15				
Teléfono:	2794255	Fax:	---	E. Mail:	--

DATOS GENERALES DE LAS MUESTRAS:					
Tipo de Muestra:	Lleche y Derivados	Muestras:	Realizado por Cliente		
Descripción:	Queso	Condición:	Normales, funda plástica		
Fecha de Recepción:	21/Jun/2012	Forma de conservación:	Refrigeración 5°C		

Nombre de las Muestras:	Código de Laboratorio	Orden	N° Libro Pag. R37-5.10	Fecha de Análisis
QUESO A	PL-C-173-21-06-12	3521	120/1539	27/06/12
QUESO B	PL-C-178-21-06-12	3522	120/1540	27/06/12
QUESO C	PL-C-174-21-06-12	3523	12/1541	27/06/12

Condiciones Ambientales:	Temperatura:	18°C - 23°C
	Humedad relativa:	40% - 55%

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO		
RESULTADOS		
Muestras:	LISTERIA MONOCYTOGENES/25g #11620 (ADAC 80 # 120501)	Requisitos**
QUESO A	DETECTADO	No Detectado
QUESO B	DETECTADO	No Detectado
QUESO C	NO DETECTADO	No Detectado

**Requisitos Microbiológicos establecidos según Codex Alimentario para Quesos Frescos.

CONCLUSIÓN	
La muestra analizada de Queso A y B	NO CUMPLEN con el Requisito Microbiológico establecido según Codex Alimentario para Quesos Frescos.
Las muestras analizadas de Queso C	CUMPLEN con el Requisito Microbiológico establecido según Codex Alimentario para Quesos Frescos.

OBSERVACIONES
<p>Se podrán solicitar modificaciones de documentos hasta 6 meses después de su emisión.</p> <p>Estos resultados corresponden exclusivamente a la muestra analizada.</p> <p>Prohibida su reproducción total o parcial, sin previa autorización de LABORATORIOS AVES S.A.</p> <p>Las observaciones y opiniones no se inscriben dentro del Alimento de Acreditación.</p> <p>Los registros generados por el análisis de la(s) muestra(s) son propiedad en los archivos del laboratorio por 5 años.</p> <p>Válido solo el Informe Original</p>



Dra. Margot Vélez de Avilés
Gerente General & Técnica





Q.F. Magdaléna Aray Andrade, M. Sc.
Directora de Calidad

Unidad de Control:
Resolución, Calle Comercio N. 2, Local 4, Av. 11, 12 y 13, Guayaquil
P.O. Box: (0904) 2102028. Teléfono: (0904) 2103017 / 2103025 ext. 200

BIBLIOGRAFÍA

1. AGUADO, V.; VITAS, A. y GARCIA-JALÓN, I. “Estudio comparativo de tres métodos de enriquecimiento para recuperación y aislamiento de *Listeria monocytogenes* en alimentos”. (Trabajo presentado en el X Congreso de Microbiología de los Alimentos, España, 1997).
2. ALPAS, H.; KALCHAYANAND, & RAY, B. Interaction of pressure, time and temperature of pressurization on viability loss of *Listeria innocuous*. Vol 14. World Journal of Microbiology & Biotechnology, U.S.A, 1998. Págs. 251-253.
3. ARCHER, D. L.; YOUNG, F. Contemporary issues. Diseases with a food vector. Clinical Microbiology. Reviews 1, U.S.A, 1988. Págs. 337-398.
4. ARTAULT, S.; BIND, J. L.; DELAVAL, & GAILLARD, N. AFNOR validation of the ALOA method for the detection of *Listeria monocytogenes* in foodstuffs. Laboratoire de Touraine. Le Bas Champeigné, Parçay-Meslay, France, 2000.
5. BOURGEOIS, C; MESCLE, J. Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Vol 1. Editorial Acribia S.A, Madrid-España, 1988. Págs. 193-195.

6. GARCÍA, J. M; ÚBEDA, P. Estudio comparativo de dos métodos para la investigación de *Listeria monocytogenes* en los productos alimentarios. Cuadernos de microbiología 10, Madrid-España, 1998. Págs. 4-5.
7. Guía de Buenas Prácticas de Manufactura para Alimentos Argentinos. Disponible en:
<http://www.ppan.com.ar/documentos/1dm21knbxk0o0.pdf>.
8. GRANADOS, R.; VILLAVERDE, M.C. Microbiología Tomo 1. Bacteriología. Características y clasificación bacteriana. Paraninfo Editorial, Madrid-España, 2003. Págs. 79-82, 107-109.
9. GRANADOS, R.; VILLAVERDE, M.C. Microbiología Tomo 2. Bacteriología. Medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Paraninfo Editorial, Madrid-España, 2003. Págs. 13-29.
10. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Sociètes). Salmonella. Microorganisms in Foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. Blackie academic & Professional. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland- U.S.A, 1996.
11. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Sociètes). *Listeria monocytogenes*. Microorganisms in Foods 5. Microbiological

specifications of food pathogens. Blackie academic & Professional. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland- U.S.A, 1996.

12. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Biological Societies). Microorganisms in Foods 6. Microbial Ecology of Food Commodities. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland- U.S.A, 1998
13. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN "NTE INEN 1528, Queso Fresco. Requisitos". Primera Edición. Ecuador. Disponible en: <http://apps.inen.gob.ec>.
14. MCLAUCHLIN, J. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *Journal of Applied Bacteriology*, London, 1987. Págs. 1-11.
15. MIONI, R.; GRIMALDI, G.; BORDIN, P.; y FERRIGNO, R. Investigación de *Listeria monocytogenes* en los alimentos: validación de un nuevo medio de cultivo selectivo y diferencial especie-específico y de un sistema rápido de identificación. *Cuadernos de Microbiología* 9, Madrid-España, 1998. Págs. 7-9.
16. NORMA NORVAL. Protocol for the validation of alternative microbiological methods.

17. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 4666. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la detección de *Listeria monocytogenes*. Colombia. 1999.
18. SORRELLS, K. M.; ENIGL, D. C.; & HATFIELD, J. R. Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *Journal Food Protection* 52, London, 1989. Págs. 571-573.
19. VLAEMYNCK, G.; LAFARGE, V.; & SCOTTER, S. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. *Journal of Applied Microbiology* 88, U.S.A, 2000. Págs. 430-441.