

Análisis de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, coliformes totales y *Salmonella* spp. en cuatro ingredientes utilizados en la planta de lácteos de Zamorano, Honduras

Víctor Ramiro Salgado Zeballos

ZAMORANO
Carrera de Agroindustria

Diciembre, 2002

Análisis de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, coliformes totales y *Salmonella* spp. en cuatro ingredientes utilizados en la planta de lácteos en Zamorano, Honduras

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura.

Presentado por

Víctor Ramiro Salgado Zeballos

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2002

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Víctor Ramiro Salgado Zeballos

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2002

Análisis de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, coliformes totales y *Salmonella* spp. en cuatro ingredientes utilizados en la planta de lácteos en Zamorano, Honduras

presentado por

Víctor Ramiro Salgado Zeballos

Aprobada:

Elsa Barrientos, M. Sc.
Asesor Principal

Claudia García, Ph. D.
Coordinadora de Carrera de Agroindustria

Rómmel Benavides, Lic.
Asesor Secundario

Antonio Flores, Ph. D.
Decano Académico

Claudia García, Ph. D.
Coordinador PIA

Mario Contreras, Ph. D.
Director General

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por guiarme y ayudarme a superar las adversidades de la vida.

A mi familia en especial a mi madre Eulalia por apoyarme y darme fuerzas para seguir adelante y nunca desfallecer, a mis hermanos Luis y Nílver por desearme un buen futuro.

A mi abuelita María por todo el cariño dado y ser un ejemplo de humildad y perseverancia.

A mis asesores Elsa Barrientos y Rómmel Benavides por su gran apoyo y confianza depositada.

A todos mis amigos dentro y fuera de Zamorano por los gratos momentos vividos, los problemas superados y su amistad desinteresada.

AGRADECIMIENTOS

A San Judas Tadeo por el favor concedido.

A Zamorano, mi alma mater, por ayudarme a formar un carácter firme y en especial a entender el verdadero significado de ayudar a los demás.

A todos los profesores por brindarnos sus conocimientos y así poder ayudar mejor al prójimo.

A los trabajadores de Zamorano gracias por su ayuda y enseñarnos lo que no se aprende en un aula.

A mis grandes amigos Claudio Peñarrieta, Gerardo Páez y Jorge Rojas por ayudarme a superar uno de los momentos más críticos en Zamorano, muchas gracias jamás lo olvidaré.

A todos mis colegas de la clase 99 y PIA 2001 - 2002. En especial a Braulio, Johnny, Dayske, Guillerno, Enrique, José Federico, Lorena y Gabriela Carrasco.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A Wolfgang Zimmermann, jefe de la Sección de Capacitación Profesional en la DSE, por la beca ofrecida para mis estudios en el programa de agrónomo

A mi muy querida madre por los constantes sacrificios realizados para poder culminar mis estudios y este sueño que se llama Zamorano.

RESUMEN

Salgado Zeballos, V. 2002. Análisis de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, coliformes totales y *Salmonella* spp. en cuatro ingredientes utilizados en la planta de lácteos de Zamorano, Honduras. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras. 35 p.

La planta de lácteos adquiere la materia prima para la elaboración de sus productos por medio de proveedores nacionales e internacionales. El objetivo del estudio fue realizar un análisis microbiológico a cuatro ingredientes de uso común: leche descremada en polvo, cocoa, azúcar blanca y estabilizador de helados, para detectar mesófilos aerobios totales, coliformes totales, mohos y levaduras (UFC/g); y la presencia de *Salmonella* spp. en leche descremada en polvo y la cocoa. Se tomaron cinco muestras al azar de cada ingrediente para realizar el recuento estándar en placa (método Pour Plate), analizándose a intervalos de una semana, el mismo diseño se aplicó para *Salmonella* spp. utilizándose el Sistema API 20E para identificación de enterobacterias. Al momento del muestreo se calculó la humedad relativa de la bodega para determinar, mediante un análisis de correlación, si pudo influenciar en los datos. Posteriormente, se realizó una correlación entre el tiempo de almacenamiento de los ingredientes y los cómputos obtenidos. Los resultados demostraron la presencia de mesófilos aerobios totales, mohos y levaduras en todos los productos, pero dentro del nivel establecido por las normas microbiológicas. No hubo evidencia de coliformes totales. No se detectó la presencia de *Salmonella* spp. en el lote de cocoa y leche descremada en polvo, pero en ésta última se aislaron e identificaron dos bacterias: *Enterobacter sakasaki* y *Acetobacter baumannii*. La humedad relativa de la bodega no influyó en el recuento microbiológico al igual que el tiempo que permanecieron los ingredientes en la bodega. Esto nos asegura que los ingredientes fueron adecuadamente elaborados y no sufrieron alteración en la bodega.

Palabras clave: Microorganismos, Pour Plate, sistema API 20E, UFC.

Elsa Barrientos, M. Sc.

Nota de Prensa

MATERIAS PRIMAS: EL PRIMER PASO HACIA UN PRODUCTO DE CALIDAD

Obtener un producto apto para el consumo humano requiere de muchos cuidados, Zamorano lo sabe y es por ello que, durante la presente gestión, se realizaron análisis microbiológicos a los principales ingredientes utilizados en la elaboración de sus productos lácteos (leche descremada en polvo, cocoa en polvo, azúcar blanca y estabilizador de helados).

Estos análisis identifican la presencia de microorganismos como mesófilos aerobios totales, coliformes totales, mohos y levaduras, además, indican el grado de higiene con el que fueron elaborados los productos. Al mismo tiempo, se realizaron pruebas para la detección de la bacteria *Salmonella* spp., responsable de severas infecciones e incluso la muerte.

Para el estudio, se analizó el último lote de cada ingrediente recibido en la planta de lácteos, se realizó un muestreo al azar para inferir mediante estadística, el número de unidades formadoras de colonia en cada lote. Los resultados de las pruebas mostraron presencia de microorganismos, en cantidades que cumplen con las normas microbiológicas establecidas. En el lote de cocoa y leche descremada en polvo, no se detectó la presencia de *Salmonella* spp., por tanto, los ingredientes son aptos para su uso.

Las pruebas se realizaron en un periodo de cuatro semanas, tiempo en el cual la bodega de la planta no afectó negativamente a los cómputos obtenidos. Este estudio permitirá a Zamorano fortalecer su plan de Buenas Prácticas de Manufactura, al asegurar el ingreso de material libre de microorganismos perjudiciales a la planta y evitar su contaminación posterior durante su almacenamiento.

Lic. Sobeyda Álvarez

CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Autoría.....	ii
	Páginas de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Agradecimiento a patrocinadores.....	vi
	Resumen.....	vii
	Nota de prensa.....	viii
	Contenido.....	ix
	Índice de Cuadros.....	xi
	Índice de Figuras.....	xii
	Índice de Anexos.....	xiii
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	ANTECEDENTES.....	1
1.2	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.3	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	2
1.4	LÍMITES DEL ESTUDIO.....	3
1.5	OBJETIVOS.....	3
1.5.1	Objetivo general.....	3
1.5.2	Objetivos específicos.....	3
2.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1	GENERALIDADES.....	4
2.2	MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON LOS INGREDIENTES	5
2.2.1	Leche en polvo.....	5
2.2.2	Cocoa amarga.....	5
2.2.3	Azúcar blanca.....	6
2.2.4	Estabilizador de helados.....	7
2.3	EFFECTO DE LOS MICROORGANISMOS EN LA SALUD HUMANA..	9
2.3.1	Mesófilos aerobios totales.....	9
2.3.2	Coliformes totales.....	9
2.3.3	Mohos y levaduras.....	9
2.3.4	Salmonella.....	10
2.3.4.1	Fiebre tifoidea.....	10
2.3.4.2	Fiebre paratifoidea y Salmonellosis.....	10
2.4	CONDICIONES DE PRODUCCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS INGREDIENTES.....	10

2.4.1	Producción higiénica de materias primas para alimentos.....	11
2.4.2	Manipulación, almacenamiento y transporte.....	11
2.4.3	Limpieza, mantenimiento e higiene del personal en la producción primaria.....	11
2.4.4	Establecimiento: requisitos de higiene en la elaboración.....	12
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1	RECURSOS TÉCNICOS.....	13
3.1.1	Ubicación del estudio.....	13
3.1.2	Equipos y materiales de laboratorio.....	13
3.2	TOMA DE MUESTRAS.....	14
3.2.1	Ingredientes seleccionados.....	14
3.2.2	Plan de muestreo.....	14
3.3	METODOLOGÍAS MICROBIOLÓGICAS UTILIZADAS.....	15
3.3.1	Cómputos estándares en placa.....	15
3.3.2	Métodos de aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp.....	16
3.3.3	VARIABLES A MEDIR.....	17
3.4	DISEÑO ESTADÍSTICO.....	17
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1	CÓMPUTOS ESTÁNDARES POR PLACA.....	19
4.1.1	Leche descremada en polvo.....	19
4.1.2	Cocoa amarga en polvo.....	20
4.1.3	Azúcar blanca.....	21
4.1.4	Estabilizador de helados.....	22
4.2	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE SALMONELLA.....	23
5.	CONCLUSIONES.....	24
6.	RECOMENDACIONES.....	25
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	26
8.	ANEXOS.....	28

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Ingredientes analizados.....	14
2.	Cantidad de placas utilizadas por microorganismo e ingrediente en en cómputos estándar.....	16
3.	Requisitos microbiológicos para cuatro ingredientes de la planta de lácteos....	17
4.	Cómputo de microorganismos presentes en las cinco muestras de leche descremada en polvo.....	20
5.	Cantidad de microorganismos presentes en el lote de leche descremada en polvo con un grado de confianza del 95%.....	20
6.	Cómputo de microorganismos presentes en las cinco muestras de cocoa amarga.....	21
7.	Cantidad de microorganismos presentes en el lote de cocoa amarga con un grado de confianza del 95%.....	21
8.	Cómputo de microorganismos presentes en las cinco muestras de azúcar blanca.....	22
9.	Cantidad de microorganismos presentes en el lote de azúcar blanca con un grado de confianza del 95%.....	22
10.	Cómputo de microorganismos presentes en las cuatro muestras del estabilizador de helados.....	23
11.	Cantidad de microorganismos presentes en el lote de estabilizador de helados con un grado de confianza del 95%.....	23
12.	Agentes etiológicos y huésped natural asociados con enfermedades producidas por <i>Salmonella</i> spp.....	29
13.	Tabla de resultados para identificación de enterobacterias por el sistema API 20E.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Esquema de muestreo para los cuatro ingredientes.....	15
2.	Esquema de diluciones para polvos solubles y gomas.....	31
3.	Diagrama de flujo del método convencional para la detección y aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.....	32

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Enfermedades producidas por diferentes especies de <i>Salmonella</i>	29
2.	Procedimientos para los cálculos estándares en placa (FDA).....	30
3.	Procedimiento para la detección y aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.....	32
4.	Procedimiento para la identificación de enterobacterias. Sistema API 20E.....	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

En general, el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en las plantas de Zamorano no es el adecuado. Según un diagnóstico realizado por Ugarte (1998), se obtuvo resultados bajos en las secciones de establecimiento, higiene y personal para la planta de lácteos. Algunas recomendaciones son muy difíciles de implementar, por ejemplo: el mejoramiento de los caminos, el aislamiento de la planta de concentrados, la falta de pavimento y animales en los alrededores cercanos.

Romero (2000) realizó el establecimiento de un sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) en la planta de lácteos para helado, crema y yogurt, siguiendo el proceso desde la recepción de la materia prima encontrando contaminación en las mismas durante el proceso de almacenamiento cuando las bolsas ya habían sido abiertas.

La planta de lácteos cuenta con numerosas tesis de evaluación microbiológica en productos terminados. Los resultados obtenidos por Morales (2002) revelaron contaminación en ciertos productos como crema ácida debido a la presencia de *Listeria* spp., coliformes totales y hongos; en queso crema con niveles mayores a los permitidos de coliformes totales y en helado con altos niveles en mesófilos aerobios. Sin embargo, no se identificó cual fue la causa principal de tales resultados. Entre estas se pueden considerar: procesos inadecuados por la falta de experiencia de los estudiantes, inadecuada limpieza de algún equipo, materias primas contaminadas y contaminación ambiental. No se puede asegurar en un 100% que la contaminación ocurrió posterior al tratamiento térmico o que los microorganismos lograron sobrevivir a este proceso.

En la actualidad, de los ingredientes principales de la planta, sólo la leche descremada en polvo posee un certificado de producción en donde se asegura la inocuidad. En el caso de la cocoa, el estabilizador de helados y el azúcar no existe hasta la fecha datos sobre estos documentos¹.

1.2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Los ingredientes de la planta de lácteos son almacenados por un período que comprende desde los 5 a 8 meses, momento en el que se realiza otro pedido. Este lapso de tiempo

¹ Revilla, Aurelio. 2002. Control sobre la calidad de los ingredientes utilizados en la planta de lácteos. Zamorano. Comunicación personal.

presenta un riesgo relativo o potencial de contaminación debido a las condiciones de la bodega ya que debido a su reducido tamaño todas las materias primas se deben almacenar juntas. También debido al movimiento constante, es muy común encontrar residuos esparcidos por el piso, combinado con la alta humedad de la temporada y la proximidad de la sección de ganado lechero, se puede crear un ambiente propicio para el desarrollo de varios microorganismos si no se da la limpieza adecuada.

En Zamorano, la planta de productos lácteos no cuenta con un estudio sobre la calidad de las materias primas que se utilizan en la elaboración de sus productos. La casa productora por ética profesional debe vender un producto inocuo pero muchas veces estas materias son importadas y provienen de compañías distribuidoras, algunas desde Canadá, por lo que la vida útil desde en momento de su fabricación es para nosotros un poco más reducida y al no realizarse un monitoreo sobre su calidad, existe el riesgo de elaborar un producto acabado contaminado, con una vida útil reducida y con riesgos a la salud humana.

En la actualidad, la planta posee un sistema de control de plagas que es ejecutado por un ente externo HIGIENIZA (Programa de Higiene Ambiental) quien realiza inspecciones calendarizadas los fines de semana, pero el control que realizan no es suficiente por la constante presencia de insectos². Por las condiciones indicadas anteriormente aún no deja de existir cierto riesgo de contaminación.

1.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las condiciones en que la bodega de la planta de lácteos permanece constantemente no son las ideales, evidenciado por: pisos sucios y pegajosos, almacenamiento conjunto entre diferentes ingredientes, recipientes no cerrados correctamente y material esparcido sobre los contenedores. Esto representa un riesgo de contaminación al producto, asociado con la alta humedad relativa y temperaturas elevadas en ciertas épocas del año.

Al sólo existir un certificado de producción e inocuidad para la leche en polvo, este estudio permitirá verificar la calidad microbiológica de los principales ingredientes de la planta, proponiendo la metodología de evaluación de manera rutinaria para establecer las bases del manejo de ingredientes como parte de las Buenas Prácticas de Manufactura para obtener un producto final libre de patógenos, con niveles de cómputos dentro de lo establecido.

Detectar la presencia y cantidad de mesófilos aerobios totales, hongos, coliformes totales y *Salmonella* spp. permitirá a obtener un producto inocuo en beneficio de la salud del consumidor y de Zamorano.

² Revilla, Aurelio. 2002. Situación del control de plagas en la planta de lácteos. Zamorano. Comunicación personal.

1.4 LÍMITES DEL ESTUDIO

El número y la amplitud de los análisis realizados fueron reducidos debido al elevado costo de los medios de cultivo y bajo presupuesto. Por esto, sólo se realizaron los análisis de rutina y de presencia e identificación de *Salmonella* spp. por ser los más importantes.

Los ingredientes no se analizaron desde su ingreso a la bodega de la planta hasta su consumo final, debido a que se contaba con suficiente material que duraría hasta principios del próximo año.

Los ingredientes se consumen demasiado rápido una vez abierta una bolsa permaneciendo alrededor de 2 días antes de agotarse. Este corto tiempo no permite repetir los análisis sobre un mismo envase. Por tanto se estudiará la calidad del ingrediente antes de ser utilizado.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Cuantificar los mesófilos aerobios totales, coliformes totales, mohos y levaduras e investigar la presencia de *Salmonella* spp. en cuatro ingredientes antes de ser utilizados, en un periodo de 4 semanas, verificando de ésta manera si cumplen con las normas establecidas.

1.5.2 Objetivos específicos

- Verificar la calidad microbiológica en leche descremada en polvo, cocoa amarga, azúcar blanca y estabilizador de helados mediante:
 - Análisis para la enumeración de mesófilos aerobios totales
 - Análisis para la enumeración de coliformes totales
 - Análisis para la enumeración de mohos y levaduras
- Investigar la presencia de *Salmonella* spp. en leche descremada en polvo y cocoa amarga.
- Determinar si la humedad relativa de la bodega, al momento del muestreo, afectó a los cálculos obtenidos.
- Determinar si el tiempo que duró la toma de muestras (4 semanas) afectó en los cálculos obtenidos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES

Varios son los artículos de periódico, radio y televisión que mencionan casos de intoxicación de personas por la ingestión de algunos productos alimenticios contaminados, debido a la utilización de materias primas no inocuas, mal procesamiento y/o almacenamiento. Un principio fundamental es que para obtener un producto de óptima calidad, las materias primas a utilizar deben estar libres de patógenos, esto también ayuda a prevenir cambios en las características físicas y químicas del producto terminado y futuros problemas con el consumidor.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) constituyen uno de los problemas de salud más extensos en el mundo actual. La gastroenteritis y otras enfermedades diarreicas son causantes de pérdidas económicas y sociales en países de Latino América y el Caribe. Estos países han destinado poco esfuerzo para la creación e implementación de herramientas de prevención de brotes de enfermedades causadas por alimentos. Además, son muy pocos los sistemas de vigilancia epidemiológica de las ETA, que permitan conocer las causas de los brotes de éstas enfermedades (Jay, 2000).

Son varios los factores que se relacionan con la reproducción de patógenos, entre los más importantes, según Jay (2000), se encuentran: temperatura, humedad, oxígeno, luz, presión osmótica, pH, actividad de agua (a_w), potencial óxido-reducción, presión mecánica, contenido de nutrientes y conservantes en los alimentos. Se debe llevar a cabo un monitoreo de todo el proceso de producción para detectar las fases con mayor riesgo de contaminación y proponer soluciones, basándose en la implementación de programas como Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), Procedimientos Operativos Estándares de Higiene (POEH) y el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC).

Según Howard (1986), diversos agentes patógenos y toxicológicos se transmiten por los alimentos. Algunos ocasionan sus efectos tóxicos a través de los metabolitos que producen los microorganismos durante su crecimiento antes de la ingestión (ingestión estafilocócica y botulismo); otros por la ingestión del microorganismo (*Salmonella*) y algunos por la ingestión de gérmenes que esporulan en el tracto digestivo y liberan la toxina (*Clostridium perfringens*). Entre los patógenos de importancia en salud pública tenemos a las bacterias del género *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*. Algunos mohos y levaduras producen micotoxinas como las aflatoxinas y ocratoxinas.

2.2 MICROORGANISMOS RELACIONADOS CON LOS INGREDIENTES

2.2.1 Leche en polvo

La leche desde el ordeño hasta su transformación avanza por diferentes procesos en donde puede ser contaminada. Según Olson y Mocquot (1980), la leche en polvo se obtiene por atomización, en donde se concentra primeramente a 40 - 45 % de extracto seco, se vuelve a pasteurizar y posteriormente se pulveriza por un dispositivo adecuado que generalmente es una cámara de desecación donde fluye el aire caliente en el mismo sentido u opuesto a las partículas de leche atomizada. El aire se calienta a temperaturas de 150 - 260 °C eliminando la humedad, el polvo seco se enfría a 38 - 40 °C donde se procede a su tamizado.

El nivel de destrucción bacteriana, según Olson y Mocquot (1980), depende del tipo de microorganismo presente y la temperatura de desecación que está dada por el aire. Se conoce que el porcentaje de sobrevivientes aumenta a medida que la temperatura disminuye. A 71.1 °C la supervivencia de *Bacillus subtilis* y *Micrococcus flavus* fue de alrededor del 22 y 27 %, respectivamente. A 93.3 y 82.2 °C la supervivencia de *B. subtilis* fue de un 12 y un 14 %, respectivamente y la de *M. flavus* del 1 y 2.5 %. La supervivencia de *Escherichia coli* fue mucho menor, del 0.02 a 93.3 °C al 0.46 % a 71.1 °C. Ésta es una típica bacteria que fácilmente se destruye por los tratamientos pasteurizantes mínimos. Por lo tanto, su supervivencia durante el proceso de desecación ilustra que dicho tratamiento no sustituye al de pasteurización. Esto demostró a los fabricantes que deben proteger cuidadosamente al producto de las posibles contaminaciones que pudieran existir entre el pasteurizador y el desecador.

Las leches concentradas, a excepción de la leche condensada azucarada y los productos concentrados acidificados, son medios favorables para el crecimiento de muchos microorganismos que se encuentran en el entorno de las fábricas que elaboran estos productos. Por ello la prevención se logra mediante esterilización o almacenamiento en cuartos fríos. La leche descremada en polvo fue vehículo de la transmisión de dos series de brotes de intoxicación estafilocócica; uno de ellos en Inglaterra en 1953 y Puerto Rico en 1956. Igualmente, en Estados Unidos se presentaron numerosos casos de salmonelosis durante 1965 debido a la contaminación con *Salmonella newbrunswick*, debido principalmente a la falta de Buenas Prácticas de Manufactura en la planta en donde se instantaneizó, resultado de una mala pasteurización antes de pasar a evaporación y la presencia de estafilococos coagulasa positiva en los tanques de alimentación de los evaporadores, lo que permitió que altas cantidades de enterotoxinas pasaran a la leche en polvo (Olson y Mocquot, 1980).

2.2.2 Cocoa amarga

Los granos de cacao, según Olson y Mocquot (1980), pasan por diversos procesos antes de convertirse en chocolate, como ser: extracción de las vainas, fermentado, desecado,

tostado, picado y prensado. Durante la fermentación se cambia la microbiología, disminuye el pH y aumenta la temperatura. Estos cambios destruyen la capacidad germinativa del grano y producen el color y aroma deseado. La desecación estabiliza los granos frente a la alteración microbiana y el tostado destruye algunos microorganismos y desarrolla el aroma final.

El hallazgo de numerosos microorganismos distintos a las bacterias formadoras de esporas es señal de un mal procesamiento o contaminación posterior probablemente debido a su alto contenido de a_w . La microflora de la cocoa consta principalmente de *Bacillus* spp. con un número variable de mohos y levaduras. Un pequeño porcentaje de muestras puede contener *Enterobacteriaceae* y otras bacterias no formadoras de esporas. También, se ha encontrado *Salmonella* spp. (Olson y Mocquot, 1980).

Los proveedores de alimentos necesitan saber si sus productos cumplen una norma o especificación que aseguren que serán aceptables hasta el final de su vida útil o de almacén. Los criterios aplicados para asegurar en las fábricas la calidad del alimento son más rigurosos que los utilizados para afirmar que son aptos para consumo (Roberts, 1995).

2.2.3 Azúcar blanca

Según Pivnick (1980), los microorganismos presentes en la caña de azúcar proceden del suelo y las estructuras vegetales en putrefacción. Con el tiempo húmedo y caluroso, el jugo que exuda la caña de azúcar al ser cortada puede contener un elevado número de microorganismos, aproximadamente 10^9 bacterias y 10^6 levaduras y mohos por gramo. Las especies bacterianas que con mayor frecuencia se encuentran en las hojas y tallos normales son *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Xanthomonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Bacillus* y *Corynebacterium*; algunas de estas especies son potencialmente patógenas para las plantas. La corteza al encontrarse lesionada por insectos u otras causas dan lugar a la penetración de bacterias, mohos y levaduras.

La zafra, práctica común en las cañeras, puede elevar la temperatura del tallo hasta 55 - 85 °C estas temperaturas no destruyen, aparentemente, muchas bacterias. *Leuconostoc mesenteriodes* ha sido detectado en las cañas aproximadamente con la misma frecuencia antes que después del quemado, debido principalmente a que son portadas por avispa que se alimentan del jugo azucarado y por herramientas contaminadas, siendo además responsable de la formación de dextrano (azúcar invertido) (Pivnick, 1980).

El jugo, según Pivnick, (1980), se somete a la fase de clarificado donde se eleva a temperaturas de 80 °C y a veces por arriba de 100 °C disminuyendo el recuento bacteriano en un 99.99 % si bien permanece el contenido de muchas esporas bacterianas y de dextrano que puede llegar a espesar el jugo causando atascos en la tubería, interfiriendo su procesamiento y retrasando la fase de clarificación con la consiguiente disminución de su efectividad sobre los microorganismos.

El azúcar morena se obtiene por evaporación del jugo clarificado que hierve bajo presiones, consecutivamente reducidas, a temperaturas superiores a 110 °C. Estas condiciones imposibilitan el crecimiento microbiano y destruyen todos los microorganismos a excepción de esporas bacterianas. En algunas azucareras se encuentran grandes poblaciones de levaduras osmófilas y hongos en los tanques de almacenamiento de los jarabes y melaza. Los productos pueden contaminarse con una pequeña porción de mohos y levaduras transportados por el aire; también pueden introducirse gran número de levaduras osmófilas en el azúcar húmedo y a su vez por el contacto con determinadas superficies, por ejemplo, tolva, cintas transportadoras, básculas. Entre las bacterias más comunes tenemos: *Desulfotomaculum (Clostridium) nigrificans*, *Clostridium butyricum* y *Bacillus termófilo* spp. Las especies de mohos más frecuentes son *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Monilia* spp. En levaduras son *Saccharomyces rouxii* y *S. mellis*, aunque se han encontrado otras especies de *Saccharomyces* y *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Candida*, *Dekkeromyces* y *Endomycopsis* (Pivnick, 1980).

El número de gérmenes presentes según el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (2002), deben ser inferiores a $10^2/g$, pero si se encuentran en niveles superiores en el azúcar refinado pueden originar serias alteraciones en los alimentos que lo utilizan como ingrediente en su elaboración. Entre los más frecuentes tenemos:

- *Bacillus stearothermophilus* y *B. coagulans* que pueden crecer en alimentos enlatados y producir ácido y no gas. El primer microorganismo forma esporas resistentes y crece a temperaturas superiores a 75 °C si bien no se desarrolla a pH inferiores a 5.2. Por el contrario *B. coagulans* no crece a temperaturas superiores a 65 °C adaptándose a un pH de 4.2.
- *Clostridium thermosaccharolyticum* que crece bien a 72 °C. En productos enlatados produce suficiente ácido que causa abombamientos por hidrógeno.
- *Desulfotomaculum (Clostridium) nigrificans* que crece a 55 °C produciendo olores fétidos de sulfuro en productos enlatados.

A los valores normales de pH de las bebidas no alcohólicas pueden crecer bacterias mesófilas, levaduras y mohos.

2.2.4 Estabilizador para helados

Según Garófalo (2002), la mayoría de estabilizadores comerciales son gelatinas o goma Guar, pudiéndose encontrar una mezcla de ambos.

La gelatina es una proteína (polímero compuesto por aminoácidos), que carece de los principales aminoácidos como vaina, tirosina y triptofano, y por lo tanto no tiene valor como alimento. En el animal, la gelatina no existe como componente, se la obtiene por hidrólisis parcial del colágeno, su precursor insoluble. En el colágeno, la unidad básica esta formada por tres cadenas de polipéptidos, enrolladas en forma de hélice y estabilizadas por uniones intramoleculares. Esto hace que el colágeno exhiba propiedades

mecánicas únicas y forme la estructura del tejido conectivo, piel y huesos de los animales (Garófalo, 2002).

La materia prima requerida para su producción se obtiene de las curtiembres y mataderos las cuales deben ser de animales sanos y sacrificados en instalaciones que cumplan todas las normas sanitarias. Se realizan diferentes pre-tratamientos:

- Los cueros son tratados con sales para su preservación.
- Las pieles se congelan para su almacenamiento y transporte.
- Los huesos de ganado vacuno, se desgrasan y se trituran antes de su transporte y procesamiento.
- Todos los días se recogen huesos frescos que deben ser procesados dentro de las 24 horas del sacrificio del animal.

Los huesos se tratan con una solución ácida para extraer los minerales (fosfato de calcio) sin afectar los contenidos orgánicos. Después de un lavado, este producto llamado “oseína”, se vuelve flexible. Los fosfatos se separan por precipitación con cal. La oseína y las pieles se procesan con ácidos para su hidrólisis a temperatura ambiente por un tiempo relativamente corto. Por otra parte, los cueros y la oseína se ponen en contacto con una solución de cal durante 5 a 10 semanas a temperatura ambiente. Luego se ajusta al pH requerido para la extracción de gelatina propiamente dicha (Garófalo, 2002).

En la extracción se obtiene un licor del 6 al 10 % de gelatina. Luego se filtra y concentra en forma continua en un evaporador al vacío. La solución se esteriliza a 145°C y se enfría rápidamente para gelificar la solución. Este gel es extrudado en forma de granos y secado con aire filtrado y aséptico para evitar presencia de microorganismos. Finalmente, se muelen los granos hasta obtener el tamaño de partícula necesario. Deben almacenarse en condiciones adecuadas, ya que son fácilmente alterables en solución o humedecidos (Garófalo, 2002).

La goma Guar según Bristhar laboratorios (2001), se deriva del endospermo molido de la planta de Guar, *Cyamopsis tetragonolobus*, de la familia de las leguminosas. La planta es cultivada comercialmente en India y Pakistán para el consumo humano y animal.

En el procesamiento comercial de la goma Guar, se utiliza una variedad de métodos para separar eficazmente el endosperma de la cáscara y del germen. La cáscara se elimina remojando en agua y posterior molienda en varias fases y cernido, o calentando y carbonizando la cáscara por tratamiento con fuego. Después se usa una molienda diferencial para separar el germen del endosperma, ya que hay una diferencia en la dureza de cada componente. Se puede usar molinos de roce, de martillo, o de rodillo. El endosperma separado, que contiene 80 % galactomano, se muele finalmente a un tamaño de partícula fino y se vende como goma Guar (Bristhar laboratorios, 2001).

Las soluciones de goma Guar como la de otros hidrocoloides vegetales están sujetas al ataque bacteriano, hongos, coliformes y es muy común encontrarlas después de los procesos térmicos debido a contaminación externa. Una mezcla de 0.15 % metil y 0.02 %

propil- parahidroxi-benzoato puede usarse para conservar las soluciones de goma guar. Para las aplicaciones en alimentos, se recomienda especialmente benzoato de sodio y ácido cítrico. El ácido sórbico y/o sorbato de potasio también se usa como un preservativo para goma Guar en quesos procesados (Bristhar laboratorios, 2001).

2.3 EFECTO DE LOS MICROORGANISMOS EN LA SALUD HUMANA

2.3.1 Mesófilos aerobios totales

Según Vanderzant y Splittstoesser (1992), se agrupan en dos géneros importantes: *Bacillus* y *Sporolactobacillus* formadores de endoesporas. Las especies encontradas en los alimentos son generalmente extensas y no poseen un hábitat definido y en general no provocan enfermedades en el ser humano. Son utilizados como indicadores de la calidad del procesamiento.

2.3.2 Coliformes totales

Según la EPA (2002), los coliformes no constituyen una amenaza para la salud; su determinación se usa para indicar si pudiera haber presentes otras bacterias posiblemente patógenas. Su presencia indica que los alimentos podrían estar contaminados con heces fecales humanas o de animales. Los microbios que provocan enfermedades (patógenos) y que están presentes en las heces causan: diarrea, retortijones, náuseas, cefaleas u otros síntomas. Estos patógenos podrían representar un riesgo de salud muy importante para bebés, niños pequeños y personas con sistemas inmunológicos gravemente comprometidos.

2.3.3 Mohos y levaduras

Según Tortajada *et al.* (2001), las micotoxinas son sustancias nocivas para la salud, generadas por el crecimiento de hongos que contaminan los alimentos, la presencia de estas toxinas implican la posible existencia de otras debido a que un solo hongo produce diferentes micotoxinas.

Entre los hongos toxigénicos destaca el género *Aspergillus* con dos variedades, el *A. flavus* y el *A. parasiticus*, por generar las aflatoxinas que son potentes hepatocarcinógenos. El *A. flavus* produce aflatoxinas B1 y B2, mientras que el *A. parasiticus* produce aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, las cuales son tóxicas y cancerígenas. Las micotoxinas del género *Fusarium* están relacionadas con el cáncer del esófago en los humanos. La ocratoxina C producida por el *A. ochraceus* y por el *Penicillium verrucosum*, está implicada con la tumorigénesis de las vías urinarias (Tortajada *et al.*, 2001).

Según Pelczar y Reid (1966), muchas levaduras relacionadas con los animales de sangre caliente no son patógenas, o por lo menos lo son ligeramente. Normalmente las bacterias del tracto intestinal las mantienen reprimidas. Cuando un organismo es sometido a tratamientos con antibióticos, las levaduras pueden proliferar libremente y causar infecciones que pueden adoptar forma de enfermedades de la piel (*Candida albicans*) que puede dar origen a infecciones generalizadas de bronquios y pulmones. El *Cryptococcus neoformans* causa una infección sistémica grave que afecta al cerebro y meninges. Es importante mencionar que estas levaduras no se adquieren a través de los alimentos.

2.3.4 Salmonella

Según Pelczar y Reid (1966), en el género *Salmonella* se incluyen varias especies patógenas para el hombre y los animales. Estos organismos son gram-negativos, no esporulados, de forma bacilar, y unos 0.5 a 0.7 μ por 1 a 3 μ . Se mueven por medio de unos flagelos peritricos. Aunque son facultativos, crecen bien en los medios ordinarios en presencia de oxígeno. En el anexo 1 se exponen las infecciones entéricas más comunes causadas por *Salmonella* spp.

2.3.4.1 Fiebre tifoidea. Es una enfermedad infecciosa causada por la *S. typhi*. La enfermedad se caracteriza clínicamente por fiebre persistente, inflamación del intestino, con ulceraciones al nivel de las placas de Peyer, tumefacción del bazo. El período de incubación suele ser de 10 a 14 días.

2.3.4.2 Fiebre paratifoidea y Salmonellosis. La enfermedad se asemeja a la fiebre tifoidea, pero es menos grave. En el hombre los que se encuentran más comúnmente son: *S. paratyphi* (tipo A), *S. schottmuellari* (tipo B) y *S. hirshfeldii* (tipo C).

En las salmonellosis se incluye cierto número de manifestaciones clínicas. En algunos casos sirve para designar casos de gastroenteritis aguda con diarrea. Comprende varias especies de importancia, pero las que se encuentran con mayor frecuencia son la *S. enteritidis* y la *S. typhimurium*.

2.4 CONDICIONES DE PRODUCCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS INGREDIENTES

Según la FAO/OMS (1998), hay que tener en cuenta las posibles fuentes de contaminación del medio ambiente. En particular, la producción primaria de alimentos no deberá llevarse a cabo en zonas donde la presencia de sustancias posiblemente peligrosas conduzca un nivel inaceptable de tales sustancias en los productos alimenticios.

2.4.1 Producción higiénica de materias primas para alimentos

Según la FAO/OMS (1998), se debe identificar todos los puntos concretos de cada actividad en que pueda existir riesgo de contaminación y adoptar medidas para reducir ese riesgo. Un enfoque basado en el sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) y Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) ayudan de gran manera a llevar a cabo tales medidas.

Los productores deberán aplicar en lo posible medidas para:

- Controlar la contaminación procedente del aire, suelo, agua, los piensos, los fertilizantes (incluidos abonos naturales), plaguicidas, medicamentos veterinarios o cualquier agente utilizado en la producción primaria.
- Controlar el estado de salud de animales y plantas, de manera que no originen ninguna amenaza para la salud humana por medio del consumo de alimentos.
- Proteger las materias primas alimentarias de contaminación fecal y otra índole.

2.4.2 Manipulación, almacenamiento y transporte

Deberán establecerse procedimientos para:

- Seleccionar los alimentos y sus ingredientes con el fin de separar todo material que manifiestamente no sea apto para el consumo humano.
- Eliminar de manera higiénica toda materia rechazada.
- Proteger los alimentos y los ingredientes para alimentos de la contaminación de plagas o de contaminantes químicos, físicos o microbiológicos, así como de otras sustancias objetables durante manipulación, el almacenamiento y el transporte.

Deberá tenerse cuidado en impedir, en la medida en que sea razonablemente posible, el deterioro y la descomposición, aplicando medidas como el control de la temperatura y la humedad y/u otros controles (FAO/OMS, 1998).

2.4.3 Limpieza, mantenimiento e higiene del personal en la producción primaria.

Se deberá disponer de instalaciones y procedimientos apropiados que aseguren:

- Toda operación necesaria de limpieza y mantenimiento de manera eficaz; y
- Que se mantenga un grado apropiado de higiene personal.

2.4.4 Establecimiento: requisitos de higiene en la elaboración

Según Jervis (1998), se debe establecer una barrera higiénica que impida la contaminación cruzada en las partes del proceso donde se manipulan los alimentos susceptibles y que están expuestos a la contaminación ambiental.

Los principales aspectos a considerar son:

- El área identificada como de alto riesgo estará completamente separada del resto mediante paredes fijas.
- Los desagües desembocarán directamente en el sumidero general exterior y ningún otro sumidero atravesará esta área.
- Los suelos, paredes, techos y todos los accesorios cumplirán con los estándares más exigentes para que no se acumule la suciedad ni otro tipo de depósitos de difícil limpieza que puedan representar un foco de contaminación.
- El aire del local se filtrará para que no contenga microorganismos; se creará una presión positiva y el aire se renovará con la suficiente frecuencia para evitar la condensación en las superficies. En ocasiones es necesario controlar la temperatura del aire.
- Los equipos y utensilios que se utilizan en un área de alto riesgo no se emplearán ni se limpiarán en ninguna otra zona de la planta.
- Los útiles de limpieza se emplearán exclusivamente para el área de alto riesgo y en ninguna otra zona. Para ello, resulta muy útil establecer los códigos de colores para marcar los utensilios.
- Cuando se introducen los materiales en el área de alto riesgo, se evitará la contaminación a través de las ruedas de las carretillas, exterior de los envases. Las envolturas exteriores se retirarán en un anexo al área y los materiales entrarán siempre en la zona por accesos restringidos y, a ser posible, se desinfectarán previamente.
- La entrada del personal en el área de alto riesgo estará estrictamente controlada. En condiciones ideales, deberían existir instalaciones separadas para el personal que trabaja en esa zona, pero si esto no resulta posible, el personal debe cambiarse de ropa que lleva en el resto de la fábrica por otra específica para esa zona y lavarse las manos a la entrada.
- El personal debe estar sometido a un severo control higiénico, supervisando el lavado de las manos y las ropas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 RECURSOS TÉCNICOS

3.1.1 Ubicación del estudio

Los ingredientes fueron tomados de la Zamoempresa de lácteos. Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo en el laboratorio de microbiología en el Centro de Evaluación de Alimentos (CEA) en Zamorano, ubicado en el valle del Yeguaré, Honduras.

3.1.2 Equipos y materiales de laboratorio

El laboratorio de la carrera cuenta con los equipos y materiales para realizar las pruebas:

Equipos:

- Autoclave.
- Balanza de precisión.
- Calentador para baño María.
- Cámara de flujo laminar.
- Homogenizador de muestras (Stomacher).
- Incubadoras.
- Microscopio.

Medios de cultivos:

- Agar Métodos Estándar (PCA), Agar Violeta Rojo Bilis (VRBA), Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar nutriente, Caldo lactosado, Caldo Selenito Cistina, Caldo Tetraciónato, Agar *Salmonella - Shigella*, Agar Mac Conkey.
- Pruebas Bioquímicas de identificación de bacterias - sistema API 20E.

Otros:

- Bolsas estériles.
- Equipo de cristalería esterilizada.
- Pinzas, cuchillos y cucharas estériles.
- Reactivos.
- Solución diluyente (buffer de fosfato o agua peptonada al 0.1%).
- Tabla psicrométrica.

- Termómetro.

3.2 TOMA DE MUESTRAS

3.2.1 Ingredientes seleccionados

Los ingredientes se seleccionaron por ser los de mayor uso y manipulación (cuadro 1).

Cuadro 1. Ingredientes analizados.

Ingredientes	Lote	Rotación (meses) ¹	Casa productora	Procedencia
Leche descremada en polvo	2001/2003	6	Gay Lea Foods	Canadá
Cocoa amarga	6402002123	8	Givaudan	USA
Azúcar blanca	Zafra 2001/2002	1	La Regia	Honduras
Estabilizador de helados	54032	8	Sabores Cosco	El Salvador

¹ El tiempo de rotación no es estándar, pudiendo haber variaciones dependiendo de la demanda.

El azúcar es un producto que siempre se mantiene en "stock" en la bodega de materiales y suministros de Zamorano, destinándose pequeñas cantidades a la planta de lácteos. No existe un abastecedor fijo para este ingrediente.

3.2.2 Plan de muestreo

Para los recuentos estándares por placa se tomaron cinco muestras al azar de cada uno de los ingredientes a excepción del estabilizador de helados que sólo se tomaron cuatro por no existir mayor disponibilidad de material en la bodega. Esto representó un total de 19 muestras las cuales se analizaron cuatro por semana.

La prueba de *Salmonella* spp. sólo se realizó en leche descremada en polvo y cocoa amarga por ser las más propensas a presentar contaminación y ser un requisito indispensable de las normas microbiológicas, para esto se tomó cinco muestras de cada ingrediente para ser analizadas semanalmente.

El procedimiento para el análisis de las muestras fue el siguiente: la primera muestra de cada ingrediente se examinó en la semana uno, la segunda muestra en la semana dos, la tercera, cuarta y quinta muestra se analizaron en la semana tres, cuatro y cinco respectivamente (figura 1). Con este método se minimizó el riesgo de post contaminación ya que, por la rápida rotación de los ingredientes, cada bolsa abierta se utilizó en un

período no mayor a cuatro días, a excepción del estabilizador cuya rotación se realiza cada mes.

Cada muestra recolectada se trasladó inmediatamente al laboratorio, donde se almacenó a temperatura ambiente por un período menor a 24 horas antes de ser analizada. Esto dio como resultado seis muestras por semana (cuatro para recuentos estándares y dos para *Salmonella* spp.).

Al momento del muestreo se registraron datos de temperatura de bulbo seco y bulbo húmedo para calcular mediante una tabla psicrométrica la humedad relativa del medio ambiente para determinar si ésta afectó en los resultados obtenidos en los análisis.

Debido al crecimiento focal de los microorganismos, el contenido de cada bolsa debió homogenizarse para obtener una muestra representativa.

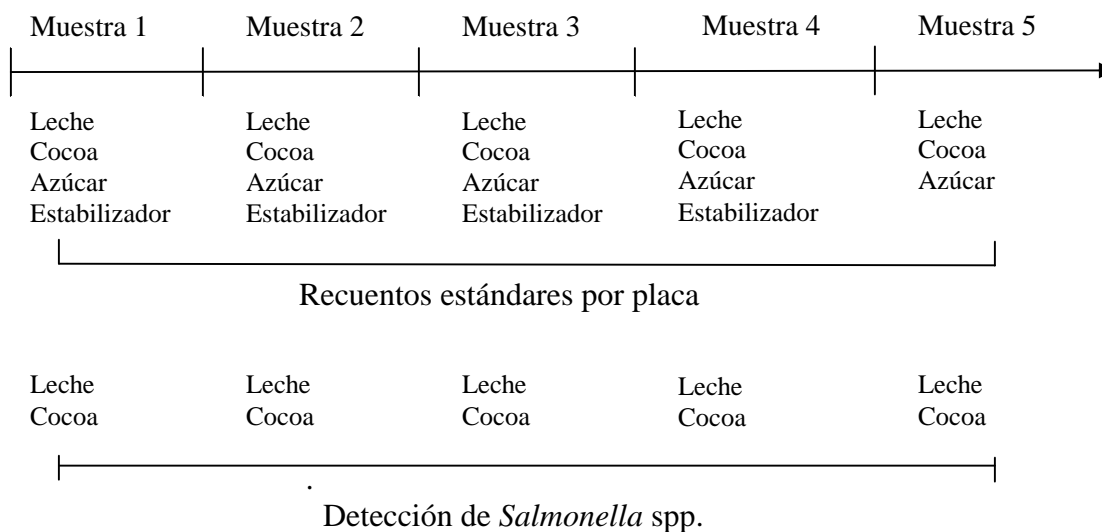


Figura 1. Esquema de muestreos para los cuatro ingredientes.

3.3 METODOLOGÍAS MICROBIOLÓGICAS UTILIZADAS

3.3.1 Cómputos estándares en placa

Debido a la falta de recursos económicos se utilizó el método tradicional de vertido en placa (Pour Plate) para los recuentos de mesófilos aerobios totales, coliformes totales, mohos y levaduras, descrito en el compendio de métodos para el análisis microbiológico de alimentos (Vanderzant y Splittstoesser, 1992) (anexo 2).

Los medios de cultivos utilizados fueron:

- Agar Métodos Estándar (PCA, por sus siglas en inglés).

- Agar Violeta Rojo Bilis (VRBA, por sus siglas en inglés).
- Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés).

Todos los análisis se realizaron hasta la dilución 1:10,000 debido a que en mayores diluciones no se detectó crecimiento. Estos análisis no se realizaron por duplicado debido al costo del material que fue de Lps 2,280. La cantidad utilizada se detalla en el cuadro 2.

Cuadro 2. Cantidad de placas utilizadas por microorganismo e ingrediente en cómputos estándares.

Ingrediente	N° de placas por microorganismo			N° total de placas
	Mesófilos Aeróbios	Coliformes Totales	Mohos y Levaduras	
Leche descremada en polvo	20	20	20	60
Cocoa amarga	20	20	20	60
Azúcar refinada	20	20	20	60
Estabilizador de helados	16	16	16	48
Total	76	76	76	228

3.3.2 Métodos de aislamiento e identificación de *Salmonella* spp.

Se utilizó el método clásico descrito en el Compendio de métodos para el análisis microbiológico de alimentos (Vanderzant y Splittstoesser, 1992), (anexo 3) el cual consiste en emplear diversos medios selectivos para aislar el microorganismo e identificarlo con pruebas bioquímicas de identificación de enterobacterias (Sistema API 20E, anexo 4).

Los medios de cultivos y de identificación utilizados fueron:

- Caldo lactosado (pre-enriquecimiento).
- Caldo Selenito - Cistina (enriquecimiento selectivo).
- Caldo Tetracionato (enriquecimiento selectivo).
- Agar *Salmonella* - *Shigella* (aislamiento en medio selectivo).
- Agar Verde Brillante (aislamiento en medio selectivo).
- Agar MacConkey (aislamiento en medio selectivo).
- Agar nutriente (aislamiento).
- Tiras API 20E.

La cantidad de tiras API 20E utilizadas dependió de los resultados positivos obtenidos con las pruebas presuntivas. Al no contar con este material se optó por almacenar una colonia obtenida de las pruebas presuntivas con agar nutriente en un tubo de ensayo con el mismo medio, cubriéndola con aceite mineral para su preservación hasta obtener las facilidades para su identificación.

3.3.3 Variables a medir

Las variables que se evaluaron en los cuatro ingredientes fueron:

- UFC/g de mesófilos aerobios totales.
- UFC/g de mohos y levaduras.
- UFC/g de coliformes totales.
- Presencia de *Salmonella* spp.

Los cálculos obtenidos fueron comparados con las normas establecidas por el gobierno de Canadá, Colombia y Honduras, las cuales son estándares para la mayoría de países (cuadro 3).

Cuadro 3. Requisitos microbiológicos para cuatro ingredientes de la planta de lácteos.

Ingredientes	Mesófilos Aerobios	Coliformes Totales	Mohos y Levaduras	<i>Salmonella</i>
	UFC/g			
Leche descremada en polvo ¹	<10,000	<1	<200	Negativa
Cocoa amarga ²	<100,000	<10	2,000 - 10,000	Negativa
Azúcar blanca ³	<200	<8	<100	No se realiza
Estabilizador de helados ⁴	<50,000	<10	<100	No se realiza

Fuente:

¹ICONTEC (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación).

²Normas canadienses.

³Azucarera Tres Valles.

⁴Compendio de análisis microbiológicos.

3.4 DISEÑO ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño completamente al azar en donde se pudo inferir los resultados obtenidos en la muestra para el lote recibido en la planta. Se calculó la media (UFC/g) para cada microorganismo, error estándar e intervalos de confianza con un 5% de significancia.

El número de muestras fue determinado por los procedimientos generales de laboratorio que recomiendan cinco muestras por lote.

Se determinó mediante un análisis de correlación si la humedad relativa al momento del muestreo influyó en los resultados obtenidos en los recuentos, de igual manera se determinó si existió correlación entre el tiempo que duró la recolección de las muestras (4 semanas) y la variación de los cálculos obtenidos.

Todos los análisis se realizaron con el programa "Statistical Analysis System" (SAS)[®].

Población de inferencia: materias primas; leche descremada en polvo (lote de 44 bolsas), cocoa amarga (lote de 60 bolsas), azúcar blanca (lote de 20 bolsas) y estabilizador de helados (lote de 4 bolsas).

Unidad experimental: sacos de leche descremada en polvo, cocoa amarga, azúcar blanca y estabilizador de helados.

Variables dependientes fueron los cálculos de las pruebas microbiológicas.

Variable independiente fueron los cuatro ingredientes, temperatura y humedad relativa de la bodega.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 COMPUTOS ESTÁNDARES POR PLACA

4.1.1 Leche descremada en polvo

Los mesófilos aerobios totales y los mohos y levaduras (*Penicillium* spp.), se encontraron dentro de las normas establecidas en las cinco muestras. No hubo evidencia de coliformes totales (cuadro 4).

La humedad relativa del ambiente no afectó los cómputos microbianos, al momento de la toma de la muestra ya que la prueba de correlación ($r = 0.0104$) no fue significativa ($P = 0.986$) ni para los mesófilos aerobios ni los mohos y levaduras ($r = -0.117$, $P = 0.851$).

No hubo correlación entre el tiempo que duró la toma de muestras (4 semanas) y los mesófilos aerobios ($r = -0.367$, $P = 0.542$) ni con los mohos y levaduras ($r = -0.727$, $P = 0.163$). Se asume que no hubo crecimiento debido a las condiciones ambientales de la bodega, debido a la protección del empaque, siendo éste una bolsa de nylon con papel Kraft. La temperatura tampoco representó un papel importante para los cómputos obtenidos.

Las unidades formadoras de colonias (cuadro 5) que se obtuvieron para el lote 2001/2003 ($N = 44$ bolsas, $n = 5$ bolsas) demostraron que la leche en polvo se encontraba apta para su utilización en la elaboración de productos. Esto permite asegurar que ingresó a la planta cumpliendo los estándares de calidad.

Cuadro 4. Cómputo de microorganismos presentes en las cinco muestras de leche descremada en polvo.

Tiempo (semanas)	Humedad Relativa ¹ (%)	Temperatura (°C)	Microorganismo (UFC/g)		
			Mesófilos aerobios	Coliformes totales	Mohos y levaduras
			VR: <10,000	VR:< 1	VR: <200
0	70	25	1,700	0	90
1	73	23	100	0	0
2	65	26	440	0	30
3	68	26	400	0	0
4	70	25	830	0	0

Controles de medio negativos excepto en la semana cuatro en PDA.

¹ Valor de la bodega al momento del muestreo.

VR: Valor de referencia según Icontec.

Cuadro 5. Cantidad de microorganismos presentes en el lote de leche descremada en polvo con un grado de confianza del 95%.

#	Microorganismo	UFC/g			
		Rango encontrado	Media	Error estándar	Límite de confianza
1	Mesófilos aerobios	100 - 1,700	694	511	183 - 1,205
2	Coliformes totales	0	0	0	0
3	Mohos y levaduras	0 - 90	24	32	0 - 56

4.1.2 Cocoa amarga en polvo

Los mesófilos aerobios totales y los mohos y levaduras (*Penicillium* spp.) en las cinco muestras de cocoa se encontraron dentro de las normas establecidas. No se detectó coliformes totales (cuadro 6).

La humedad relativa de la bodega al momento del muestreo no afectó al cómputo de mesófilos aerobios totales ya que la prueba de correlación ($r = 0.289$, $P = 0.637$) no fue significativa, igualmente con los mohos y levaduras ($r = 0.094$, $P = 0.88$).

El tiempo que duró la toma de muestras (4 semanas) no afectó ni al cómputo de mesófilos aerobios ($r = 0.588$, $P = 0.2967$) ni a los mohos y levaduras ($r = -0.776$, $P = 0.122$). No hubo crecimiento debido a las condiciones ambientales de la bodega. La temperatura tampoco afectó los cómputos microbianos.

El lote 6402002123 (N =60 bolsas, n =5 bolsas) de cocoa en polvo se encontró apto para su utilización en la elaboración de los productos de la planta (cuadro 7).

Cuadro 6. Cómputo de microorganismos presentes en las cinco muestras de cocoa amarga.

Tiempo (semanas)	Humedad relativa (%)	Temperatura (°C)	Microorganismo (UFC/g)		
			Mesófilos aerobios	Coliformes totales	Mohos y levaduras
			VR: <100,000	VR: <10	VR: <10,000
0	70	25	1,400	0	260
1	73	26	2,000	0	30
2	65	23	1,600	0	50
3	68	26	1,120	0	0
4	70	25	3,900	0	10

Controles de medio negativos excepto en la semana cuatro en PDA.

VR: Valor de referencia según las normas canadienses.

Cuadro 7. Cantidad de microorganismos presentes en el lote de cocoa amarga con un grado de confianza del 95%.

#	Microorganismo	UFC/g			
		Rango encontrado	Media	Error estándar	Límite de confianza
1	Mesófilos aerobios	1,120 - 3,900	2,004	929	1,075 - 2,933
2	Coliformes totales	0	0	0	0
3	Mohos y levaduras	0 - 260	70	91	0 - 161

4.1.3 Azúcar blanca

Los mesófilos aerobios totales se encontraron dentro de las normas establecidas, a excepción de la semana tres que correspondió a una bolsa mojada por la limpieza realizada en la bodega. El material de empaque (bolsas de plástico permeable) no ofreció la debida protección al material. Los mohos y levaduras se encontraron dentro de las normas establecidas y no hubo presencia de coliformes totales (cuadro 8).

Los mesófilos aerobios no fueron afectados por la humedad relativa de la bodega ya que no hubo correlación ($r = -0.809$, $P = 0.08$) al igual que los mohos y levaduras ($r = -0.899$, $P = 0.06$).

La prueba de correlación entre el tiempo que duró la toma de muestras (4 semanas) y los mesófilos aerobios no fue significativa ($r = -0.166$, $P = 0.7893$) ni para los mohos y levaduras ($r = -0.1291$, $P = 0.8361$). La temperatura no afectó los cómputos microbianos.

Las unidades formadoras de colonias (cuadro 9) del lote de zafra 2001/2002 (N =20 bolsas, n =5 bolsas) demostraron que el azúcar blanca se encontraba apta para su utilización como ingrediente.

Cuadro 8. Cómputo de microorganismos presentes en las cinco muestras de azúcar blanca.

Tiempo (semanas)	Humedad relativa (%)	Temperatura (°C)	Microorganismo (UFC/g)		
			Mesófilos aerobios	Coliformes totales	Mohos y levaduras
			VR: <200	VR: < 8	VR: <100
0	70	25	100	0	10
1	73	26	0	0	0
2 ^o	65	23	320	0	30
3	68	26	20	0	10
4	70	25	20	0	0

Controles de medio negativos excepto en la semana cuatro en PDA.

^o La bolsa se encontraba húmeda al momento del muestreo.

VR: Valor de referencia según la azucarera Tres Valles.

Cuadro 9. Cantidad de microorganismos presentes en el lote de azúcar blanca con un grado de confianza del 95%.

#	Microorganismo	UFC/g			
		Rango encontrado	Media	Error estándar	Límite de confianza
1	Mesófilos aerobios	0 - 320	92	101	0 - 193
2	Coliformes totales	0	0	0	0
3	Mohos y levaduras	0 - 30	10	9	1 - 19

4.1.4 Estabilizador de helados

Los niveles de mesófilos aerobios totales y mohos y levaduras se encontraron dentro de las normas establecidas. No se detectó coliformes totales (cuadro 10).

La humedad relativa del ambiente en la bodega no afectó los cómputos microbianos ya que la prueba de correlación ($r = 0.514$) no fue significativa ($P = 0.485$) para mesófilos aerobios ni para los mohos y levaduras ($r = -0.198$, $P = 0.802$).

No hubo correlación entre el tiempo que duró la toma de muestras (3 semanas) con los mesófilos aerobios ($r = 0.447$, $P = 0.552$) ni con los mohos y levaduras ($r = 0.774$, $P = 0.225$). Se asume que no hubo un crecimiento debido a las condiciones ambientales de la bodega, debido a la protección del empaque, constituido por una bolsa de nylon sellado al vacío con un embalaje de cartón. Las temperaturas no afectaron a los cómputos obtenidos.

Las unidades formadoras de colonias (cuadro 11), que se obtuvieron para el lote 54032 (N =4 bolsas, n =4 bolsas) demostraron que el estabilizador se encontraba apto para su utilización. Se asegura que ingresó a la planta cumpliendo las normas microbiológicas.

Cuadro 10. Cómputo de microorganismos presentes en las cuatro muestras de estabilizador de helados.

Tiempo (semanas)	Humedad relativa (%)	Temperatura (°C)	Microorganismo (UFC/g)		
			Mesófilos aerobios	Coliformes totales	Mohos y levaduras
			VR: <50,000	VR: <10	VR: <100
0	70	25	40	0	0
1	73	26	50	0	0
2	65	23	40	0	0
3	68	26	50	0	20

Controles de medio negativos excepto en la semana cuatro en PDA.

VR: Valor de referencia según el compendio de análisis microbiológicos.

Cuadro 11. Cantidad de microorganismos presentes en el lote de estabilizador de helados con un grado de confianza del 95%.

#	Microorganismo	UFC/g			
		Rango encontrado	Media	Error estándar	Límite de confianza
1	Mesófilos aerobios	40 - 50	45	6	39 - 51
2	Coliformes totales	0	0	0	0
3	Mohos y levaduras	0 - 20	5	10	0 - 15

4.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE SALMONELLA

Las pruebas presuntivas de *Salmonella* spp. en cocoa resultaron negativas en las cinco muestras. El lote se encontró libre de este microorganismo.

Las pruebas presuntivas en leche descremada en polvo resultaron positivas en dos muestras. Medio *Salmonella-Shigella* (muestra 1) y medio Selenito-Cistina (muestra tres).

Las colonias aisladas se identificaron obteniendo para la muestra uno, con un bajo nivel de discriminación, la bacteria *Enterobacter sakasaki* la cual, según la FDA (2002), fue responsable de producir altos índices de mortalidad en los recién nacidos y personas inmunocomprometidas que consumieron alimentos contaminados con éste patógeno. Para la muestra tres se identificó, con un bajo nivel de discriminación, la bacteria *Acetobacter baumannii* que según Ángeles (s.f.), es la responsable de infecciones graves como sepsis, neumonía y meningitis.

Estas bacterias no forman parte de los análisis recomendados por el FDA. Se necesitarían más pruebas para detectar la cantidad presente de estas bacterias en los ingredientes y si son potencialmente nocivas.

5. CONCLUSIONES

Los cálculos de mesófilos aerobios totales, coliformes totales, mohos y levaduras en los cuatro ingredientes analizados se mantuvieron dentro de las normas establecidos, encontrándose aptos para su utilización en la elaboración de productos lácteos.

No se detectó la presencia de *Salmonella* spp. en el lote de leche descremada y cocoa amarga, tampoco hubo contaminación posterior en bodega.

Los ingredientes fueron adecuadamente elaborados y empacados por lo que no sufrieron alteración durante el transporte y almacenamiento en la bodega de la planta.

Los resultados no fueron influenciados por la humedad relativa de la bodega al momento de la toma de datos.

No hubo crecimiento bacteriano a lo largo de las cuatro semanas que duró la toma de muestras.

Aunque las condiciones de manejo de la bodega no son las óptimas, los cálculos permanecieron dentro de los parámetros microbiológicos debido al tipo de empaque y a las características del producto (baja a_w).

6. RECOMENDACIONES

Exigir al proveedor de la materia prima los certificados de análisis microbiológicos.

Realizar este tipo de análisis de manera periódica, al ingresar un ingrediente a la bodega.

Mejorar la limpieza de la bodega realizando el almacenado de los ingredientes por separado sin estibar material extraño sobre las bolsas.

Destinar una persona para el manejo exclusivo de la bodega y restringir el acceso a la misma.

Implementar los planes de BPM para mejorar la calidad de los productos y evitar el ingreso de material contaminante.

Realizar análisis para detectar la presencia de micotoxinas.

7. BIBLIOGRAFÍA

Ángeles, M. s.f. *Acinetobacter baumannii* (en línea). Barcelona, España. Consultado 31 octubre del 2002. Disponible en http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/acinetobacter.htm

Bristhar laboratorios. 2001. Goma Guar (en línea). Venezuela. Consultado 1 septiembre del 2002. Disponible en http://www.bristhar.com.ve/goma_guar.htm

Compañía Nacional de Chocolates. 2001. Parámetros de control de procesos (en línea). Colombia. Consultado 6 julio del 2002. Disponible en http://www.chocolates.com.co/pi_boletín_02.htm

EPA. 2002. Estándares del reglamento nacional primario de agua potable (en línea). Estados Unidos. Consultado 5 septiembre del 2002. Disponible en <http://www.epa.gov/safewater/agua/estandares.html>

FAO/OMS. 1998. Codex alimentarius: Requisitos generales (higiene de los alimentos). 2 ed. Roma, Italia, Secretaría del programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. 55p.

FDA. 2002. FDA warns about possible *Enterobacter sakazakii* infections in hospitalized newborns fed powdered infant formulas (en línea). USA. Consultado 30 octubre del 2002. Disponible en <http://www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/2002/ANS01146.html>

Garófalo, M. 2002. Gelatina (en línea). Buenos Aires, Argentina. Consultado 1 septiembre del 2002. Disponible en <http://www.mundohelado.com/materiasprimas/estabilizantes-gelatina.htm>

Health Protection Branch (HPB) Government of Canada. 1999. Health Protection Branch Standard and Guidelines for Microbiological Safety of Food Interpretative Summary (en línea). Consultado 30 de septiembre del 2001. Disponible en http://www.who.it/docs/fdsaf/Mbiol/tab_refer.htm

Howard, R. 1986. Sanidad alimentaria. España, Acribia. 261 p.

Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. s.f. Normas de calidad (en línea). Colombia. Consultado 13 de julio del 2002. Disponible en <http://www.bna-sa.com.co/normas/leche2.html>

- Jay, J. M. 2000. Modern food microbiology. 6 ed. Maryland, US. Aspen Publishers Inc. 679 p.
- Jervis, D. 1998. La higiene en la fabricación de productos lácteos. Trad Rosa Oria. *In* Early, R. ed. Tecnología de los productos lácteos. Zaragoza, España. Acribia. p 413-442.
- Morales , J. 2002. Evaluación microbiológica de seis productos lácteos y seis productos cárnicos elaborados en Zamorano. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 53 p.
- Olson, J.; Mocquot, Y. 1980. Leche y productos lácteos. Trad. Juan Ordóñez. *In*. International Commisión on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Ecología microbiana de los alimentos 2: Productos alimenticios. Zaragoza, España, Acribia. p. 492-497.
- Pelczar, M.; Reid, R. 1966. Microbiología. Trad. L. Hontañón. 2 ed. Madrid, España, Ediciones Castilla. 664 p.
- Pivnick, H. 1980. Azúcar, Cacao, Chocolate. Trad. José Salguero. *In*. International Commisión on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Ecología microbiana de los alimentos 2: Productos alimenticios. Zaragoza, España, Acribia. p. 787-828.
- Preafán, F. s.f. Azúcar refinado (en línea). Colombia. Consultado 13 de julio del 2002. Disponible en <http://www.perafan.com/ea02cali.html>
- Ratto, M. 1982. Examen microbiológico de leche y productos lácteos. Darnstadt, Germany, Verlag Ernst Giebeler. 35 p.
- Roberts, D. 1995. Microbiología práctica de los alimentos. 2 ed. España, Acribia. 276 p.
- Romero, R. 2000. Establecimiento de un sistema de análisis de riesgos y puntos críticos de control para helado y yogur en Zamorano. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 92 p.
- Tortajada, F.; Castell, G.; Tornero, B.; Gimeno, C. 2001. Micotoxinas y cáncer pediátrico (en línea). Valencia, España. Consultado 5 de septiembre del 2002. Disponible en <http://db2.doyma.es/pdf/126/126v57n03a13017206pdf001.pdf>
- Ugarte, E. 1998. Diagnóstico operacional de las plantas procesadoras de alimentos y bases para la implementación de Buenas Prácticas de Manufactura en la planta de Industrias Horto-Frutícolas de Zamorano. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 92 p.
- Vanderzant, C.; Splittstoesser, D. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. 3 ed. Washington, D. C. American Public Health Association Inc. (APHA). 1219 p.

8. ANEXOS

Anexo 1. Enfermedades producidas por diferentes especies de *Salmonella*.

Cuadro 12. Agentes etiológicos y huésped natural asociados con enfermedades producidas por *Salmonella* spp.

Enfermedad humana	Agente etiológico	Huésped natural	Observaciones
Fiebre tifoidea	<i>S. typhosa</i>	Hombre	Transmisión portadores humanos, moscas; también por alimentos y agua.
Fiebre paratifoidea	<i>S. paratyphi</i> <i>S. schottmuelleri</i> <i>S. hirshfeldii</i>	Hombre	Denominado también <i>S. paratyphi</i> A, <i>S. paratyphi</i> B, <i>S. paratyphi</i> C.
Gastroenteritis aguda	<i>S. typhimurium</i>	Roedores	Patógeno de los roedores, en los que causa una infección del tipo tifoideo.
Gastroenteritis o fiebre entérica	<i>S. choleraesuis</i>	Suidos y otros animales	Invasor secundario en el cólera del cerdo; transmisión al hombre por la carne contaminada.
	<i>S. oranienburg</i>	Pollos y otras aves	Transmisión al hombre por huevos secos.
	<i>S. montevideo</i>	Algunas aves y mamíferos	Transmisión al hombre por algunos productos de huevo seco.
	<i>S. newport</i>	Ratas, puercos, pollos y aves	Transmisión al hombre en carne y huevos.
Gastroenteritis	<i>S. enteritidis</i>	Muchos animales y aves	Se encuentra en la carne y los huevos, especialmente huevos de pata.
	<i>S. anatum</i>	Aves	Se encuentra en huevos secos.
Gastroenteritis rara	<i>S. gallinarum</i>	Aves	Causa tifoidea aviar: una variedad <i>S. pullorum</i> , causa la diarrea blanca aviar de los pollos

Fuente: Pelczar y Reid (1966).

Anexo 2. Procedimiento para los cómputos estándares en placa (FDA).

1. Desinfectar el área de trabajo con alcohol etílico al 70%, fenol o formaldehído.
2. Derretir el medio de cultivo en agua hirviente, luego coloque en baño de agua a 45°C.
3. Ajustar la temperatura del agua de dilución a 15-25°C.
4. Marcar los platos Petri en la tapa (por duplicado), indicando el número de muestra, el factor de dilución, fecha e iniciales del analista.
5. Mezclar la muestra para uniformizarla.
6. Desinfectar con alcohol etílico al 70 % la parte del recipiente por donde va a ser abierto para tomar la muestra.
7. Tomar 11 g de la muestra y diluirla en 99 ml de agua peptonada (0.1%) para obtener una dilución de 1:10. Para gomas, debido a su poder espesante se debe pesar 5 g de la muestra y diluirla en 495 ml de agua peptonada para obtener la dilución 1:100.
8. Preparar las diluciones decimales a partir de esta dilución, transfiriendo 1 ml de la muestra con una pipeta estéril a un frasco de dilución con 99 ml de agua de dilución para tener el factor 1:1,000. En gomas con este paso se obtendrá la dilución 1:10000.
9. Preparar las diluciones de tal manera que en un plato Petri como mínimo, el número de colonias fluctúe entre 25-250. Mezclar bien éstas diluciones.
10. Introducir la pipeta en la dilución no más de 2.5 cm y succione con el bulbo de seguridad, luego con la punta de la pipeta pegada a la pared interna del recipiente ajuste la cantidad exacta (1 ml) y transfiera el contenido del plato Petri.
11. Para obtener el factor 1:100 se debe tomar 0.1 ml de la dilución 1:10 y colocarla en el plato Petri, para el factor 1:10,000 se debe tomar 0.1 ml de la dilución 1:1,000 respectivamente. En gomas para obtener el factor 1:10 se debe tomar 2 ml de la dilución 1:100 y para el factor 1:1,000 se debe colocar en el plato petri 0.1 ml de la dilución 1:100.
12. Agregar 10 a 12 ml del medio de cultivo a 45°C en cada plato. Destape el plato cerca de un mechero y sólo lo suficiente para verter el medio de cultivo. Para mesófilos aerobios se debe utilizar el medio PCA, para coliformes totales VRBA y para hongos el medio PDA más ácido tartárico (1.8 ml/100 ml de medio).
13. Mezcle el medio de cultivo con la muestra en forma lenta con cinco movimientos rotativos en dirección a las agujas del reloj, cinco en sentido contrario, cinco en línea recta de izquierda a derecha y viceversa, y finalmente cinco veces en la forma que inicio el mezclado.
14. Deje los platos en reposo hasta que el medio de cultivo se solidifique.
15. Invierta los platos excepto el de PDA, para evitar que el agua de condensación facilite el crecimiento de colonias esparcidas debido a la alta humedad.
16. Incubar a la temperatura requerida para cada tipo de microorganismo.
 - Mesófilos aerobios totales: 35- 37°C por 24-48 horas.
 - Coliformes totales: 35°C por 24 horas.
 - Hongos: a T° ambiente por 2-5 días.
17. Llevar siempre un control del medio de cultivo (placa Petri solo con el medio de cultivo) y del agua de dilución (placa Petri con medio de cultivo y agua de dilución).

Fuente: Vanderzant y Splittstoesser, 1992.

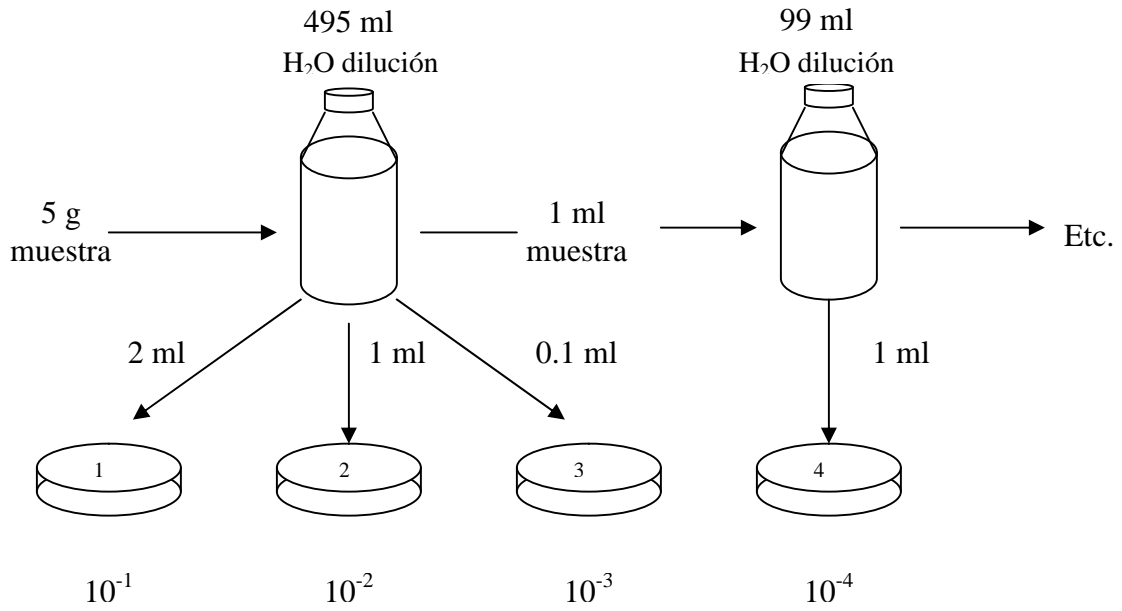
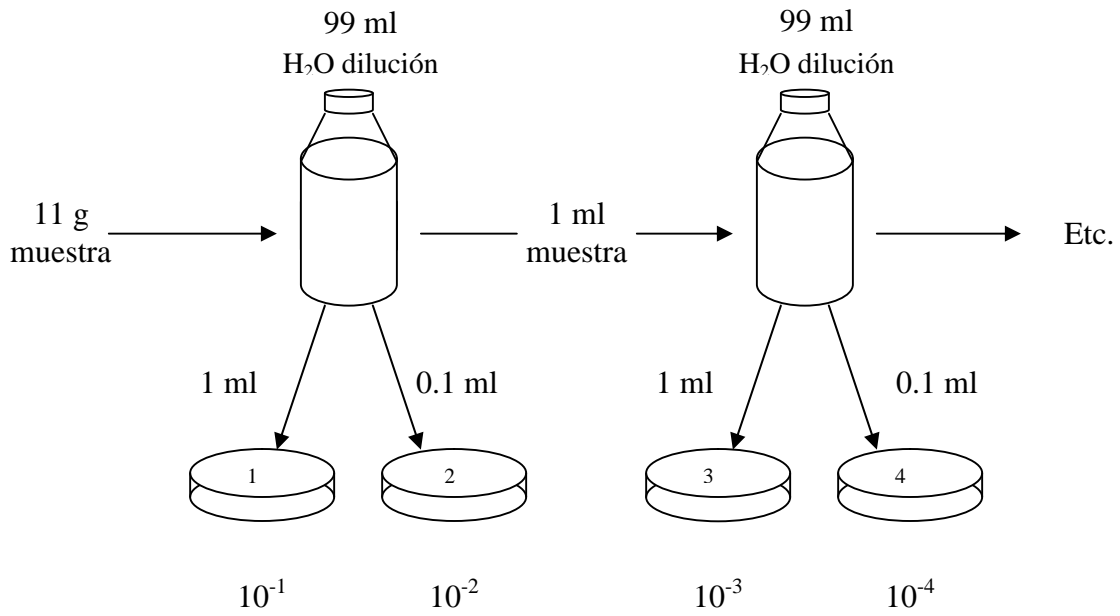


Figura 2. Esquema de diluciones para polvos solubles y gomas.

Fuente: Vanderzant y Splittstoesser, 1992.

Anexo 3. Procedimiento para la detección y aislamiento de *Salmonella* spp.

1. Tomar 25 g de la muestra y adicionar 225 ml de caldo lactosado, dejar incubar a 35°C por 24 horas (pre-enriquecimiento).
2. Inocular un mililitro del cultivo efectuado en 10 ml de caldo Selenito - Cistina y en 10 ml de caldo tetratonato (añadir 0.2 ml de solución de Yodo/10 ml de caldo). Incubar a 35-37°C durante 18-24 horas (enriquecimiento selectivo).
3. De cada caldo, transferir una asada, mediante la técnica de Frobisher, a cada uno de las placas con medio Agar Verde Brillante, Agar *Salmonella-Shigella* y Agar Mac Conkey. Incubar a 35°C por 24 horas (aislamiento selectivo).
4. En caso de haber una reacción positiva y formación de colonias sospechosas, se deberá aislar una y transferirla a un medio Agar Nutriente antes de utilizar las tiras API 20 E.
5. Para confirmar la existencia de *Salmonella* spp. se debe utilizar las tiras API 20E inoculándolas con la colonia obtenida en el Agar nutriente (pruebas bioquímicas de identificación de enterobacterias).

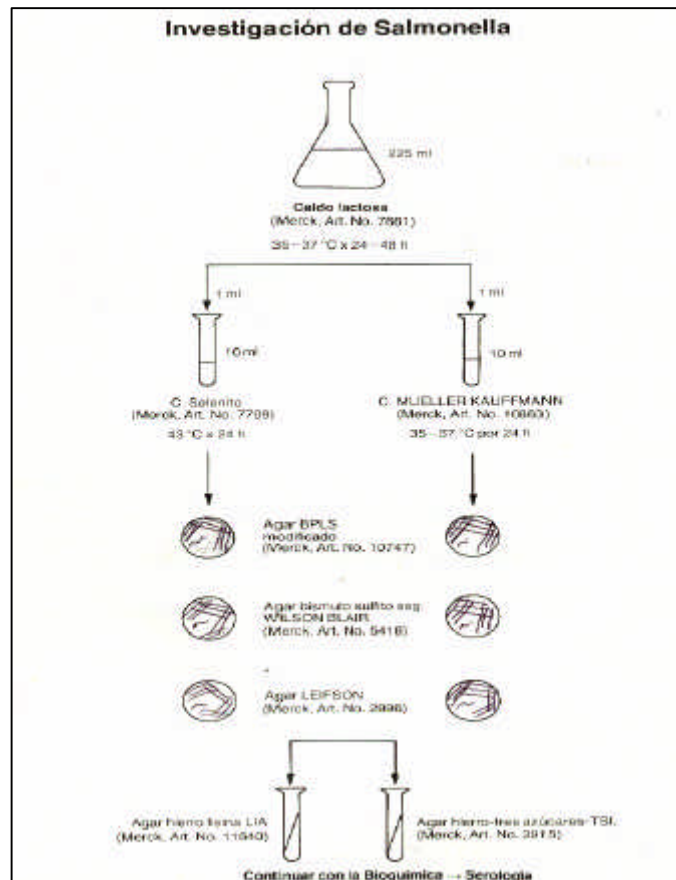


Figura 3. Diagrama de flujo del método convencional para la detección y aislamiento de *Salmonella* spp.

Fuente: Ratto, M. A. 1982.

Anexo 4. Procedimiento para la identificación de enterobacterias. Sistema API 20 E.

Las tiras API 20E son un sistema para la identificación de Enterobacterias y otros bacilos gram-negativos no exigentes, mediante la utilización de 23 tests bioquímicos estandarizados y miniaturizados.

Preparación de la galería

- Reunir el fondo y la tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 ml de agua destilada en los alvéolos del fondo con el fin de crear una atmósfera húmeda.
- Sacar la galería de su envase.
- Colocar la galería en la cámara de incubación.

Preparación del inóculo

- Abrir un a ampolla de NaCl 0.85% Médium (5 ml) o utilizar un tubo que contenga 5 ml de agua fisiológica estéril.
- Con la ayuda de una pipeta, tomar una sola colonia bien aislada de la placa de gelosa.
- Realizar una suspensión bacteriana utilizando la escala de McFarland homogenizando cuidadosamente las bacterias en el medio.

Inoculación de la galería

- Llenar tubos y cúpulas de los tests [CIT], [VP] y [GEL] con la suspensión bacteriana.
- Llenar sólo los tubos (y no las cúpulas) de los otros tests.
- Crear anaerobiosis en los tests ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, llenando su cúpula con aceite de parafina.
- Cerrar la cámara de incubación y colocar a 35-37°C durante 18-24 horas.

Lectura de la galería

- Después de la incubación leer la galería con la ayuda de la Tabla de Lectura.
- Anotar en la hoja de resultados las reacciones espontáneas.
- Si 3 tests o más (test GLU + o -) son positivos, registrar la lectura del test GLU, y después revelar los test que requieran reactivos:
 - Test TDA: añadir 1 gota de reactivo TDA. Una coloración marrón rojiza indica una reacción positiva.
 - Test IND: añadir 1 gota del reactivo de JAMES. Una coloración rosa difundido sobre la cúpula indica una reacción positiva.
 - Test VP: añadir un agota de reactivo NIT 1 y NIT 2 en el tubo GLU. Esperar de 2 a 5 minutos. Una coloración roja indica una reacción positiva. Una reacción negativa (coloración amarilla) puede deberse a la reducción de los nitratos a N₂ (acompañada muchas veces con la formación de burbujas): añadir de 2 a 3 mg de reactivo de Zn en la cúpula de GLU. Si después de 5 minutos el tubo permanece amarillo indica una reacción (N₂) positiva, que debe anotarse en la hoja de resultados. Si la cúpula adquiere un coloración naranja-roja, la reacción es negativa, por lo tanto los nitratos que todavía se encuentran presentes en el tubo han sido ya reducidos a nitritos por la presencia de Zinc.

Identificación

La identificación se obtiene a partir del perfil numérico.

- **Determinación del perfil numérico:**
En la hoja de resultados, los tests están separados en grupos de tres y un valor de 1, 2 ó 4 se indica para cada uno. La galería API 20 E consta de 20 tests, los valores en el interior de cada grupo corresponden a las reacciones positivas. Sumando los valores de los tests positivos para cada grupo, se obtiene 7 cifras que corresponden al perfil numérico.
- **Identificación:**
Se realiza con la ayuda del API 20 E Index (buscar el perfil numérico en la lista de los perfiles) o con la ayuda del programa informático para identificación.

En algunos casos, el perfil de 7 cifras no discrimina suficientemente, debiendo realizarse los test complementarios:

- Reducción de nitratos a nitritos (NO_2)
- Reducción de los nitratos a nitrógeno (N_2)
- Movilidad (MOB)
- Cultivo en Mac Conkey (McC)
- Oxidación de la glucosa (OF-O)
- Fermentación de la glucosa (OF-F)


Los tests complementarios mencionados pueden ser utilizados para componer un perfil de 9 cifras, descifrable por el programa de identificación.

Cuadro 13. Tabla de resultados para la identificación de enterobacterias, Sistema API 20E.

TABLA DE LECTURA					
TESTS	SUBSTRATOS	CANT	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	orto-nitro-fenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) isopropil-β-galactopiranosido (IPTG)	0,23 mg	beta-galactosidasa	incolore	amarillo (1)
		7,5 µg			
ADH	arginina	1,9 mg	arginina dehidrogenasa	amarillo	rojo / naranja (2)
LDC	lisina	1,9 mg	lisina descarboxilasa	amarillo	rojo / naranja (2)
ODC	ornitina	1,9 mg	ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo / naranja (2)
[CIT]	citrato sódico	0,83 mg	utilización del citrato	verde pálido / amarillo	azul-verdoso / azul (3)
H ₂ S	sulfato sódico	76,0 µg	producción de H ₂ S	incolore / grisáceo	depósito negro / línea sutil
URE	urea	0,76 mg	ureasa	amarillo	rojo / naranja (2)
TDA	triptofano	0,36 mg	triptofano desaminasa	TDA / inmediato amarillo marrón-rojo	
IND	triptofano	0,19 mg	producción del indol	JAMES / inmediato incolore verde pálido / amarillo rosa	
[VP]	creatina piruvato sódico	0,36 mg 1,9 mg	producción de acetoina	VP 1 + VP 2 / 10 min incolore rosa / rojo (5)	
[GEL]	gelatina de Kohn	0,17 mg	gelatinasa	no hay difusión de pigmento negro	difusión de pigmento negro
GLU	glucosa	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo / amarillo gris
MAN	manitol	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
INO	inocitol	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
SOR	sorbitol	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
RHA	ramnosa	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
SAC	sacarosa	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
MEL	melibiosa	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
AMY	amigdalina	0,57 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
ARA	arabinosa	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
OX	(ver ficha del test de oxidasa)		citocromo-oxidasa	(ver ficha del test de oxidasa)	
Reducción de los nitratos tubo GLU	nitrato potásico	76,0 µg	producción de NO ₂ reducción a gas N ₂	NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min amarillo rojo	
				Zn / 5 min naranja-rojo amarillo	
MOB	API M Medium o microscopia		movilidad	inmovil	movil
McC	medio MacConkey		crecimiento	ausencia	presencia
OF-F OF-D	glucosa (API OF Medium)		cerrado: fermentación abierto: oxidación	verde verde	amarillo amarillo

(1) Un amarillo muy pálido debe considerarse como positivo.
(2) Un color naranja que aparece después de 36-48 H de incubación debe considerarse como negativo.
(3) La lectura debe hacerse en la cúpula (zona de aerobiosis).
(4) La fermentación empieza en la parte inferior de los tubos, la oxidación empieza en la cúpula.
(5) La aparición de una coloración rosa pálido después de 10 minutos debe considerarse como negativa.

Fabricante - bioMérieux sa



bioMérieux sa
au capital de 77 421 420 F
673 620 399 RCS LYON
69280 Marcy-l'Étoile / France
tél. (33) 04 78 87 20 00 / fax (33) 04 78 87 20 90
<http://www.biomérieux.com>

bioMérieux, Inc.
595 Anglum Road, Hazelwood,
Missouri 63042-2320 / USA
tel. (1) 314.731.6500 / fax (1) 314.731.6700

Impreso en Francia

Fuente: Laboratorios Biomérieux