

Evaluación microbiológica de seis productos lácteos y seis productos cárnicos elaborados en Zamorano

José Renato Morales Morales

ZAMORANO
Carrera de Agroindustria

Abril, 2002

Evaluación microbiológica de seis productos lácteos y seis productos cárnicos elaborados en Zamorano

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

Presentado por

José Renato Morales Morales

Zamorano, Honduras

Abril, 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

José Renato Morales Morales

Zamorano, Honduras
Abril, 2002

Evaluación microbiológica de seis productos lácteos y seis productos cárnicos elaborados en Zamorano

presentado por

José Renato Morales Morales

Aprobada:

Elsa Barrientos, M.Sc.
Asesor Principal

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

Adela Acosta, D.C.T.A.
Asesor Secundario

Antonio Flores, Ph.D.
Decano Académico

Manuel Morales, M.Sc.
Asesor secundario

Keith Andrews, Ph.D.
Director

Aurelio Revilla, M.S.A.
Coordinador PIA

DEDICATORIA

A Dios por dejarme sentir su infinito amor cada día de mi vida y por darme la fuerza para vencer las adversidades cotidianas.

A mi hermosa familia, mis padres Raúl y Soledad, mis hermanos Mario, Blanca Luz, Jersson, Juan y mi pequeño sobrino Renato Sebastián, por haberme dado su inmenso amor; y por compartir conmigo los buenos y malos momentos.

A mi abuelita Rosita, por todo el amor que me ha dado y porque nunca se ha olvidado de mí en sus oraciones

A mis familiares y amigos por todos los consejos y palabras de aliento que siempre me brindaron.

A Antonina Castillo, Guillermo Cueva y sus maravillosos hijos Erna, Guillermo y Olga por el inmenso cariño y sobre todo, por tratarme como un miembro más de la familia. Gracias de todo corazón.

A mis amigos dentro y fuera de Zamorano, por todos los gratos e innumerables momentos que compartimos.

AGRADECIMIENTOS

Al Zamorano, especialmente a la Carrera de Agroindustria por haberme dado la oportunidad de formarme profesionalmente.

A mis asesores Elsa Barrientos, Adela Acosta y Manuel Morales por su valiosa ayuda, paciencia y sobre todo por la gran amistad que me brindaron.

Al profesor Aurelio Revilla por todo el apoyo que me brindó como coordinador PIA y como amigo.

A los empleados de las Plantas de Lácteos y Cárnicos por su amistad y apoyo.

A mis hermanos zamoranos Carlos Toapanta, Eduardo Moncayo, Esteban Cifuentes, Paúl Jaramillo, Sebastián Ortiz, Santiago Montesdeoca, Juan Piñuela, Ricardo Garcés Olga Cueva, Guillermo Cueva, y Rodrigo Borja por hermosa y verdadera amistad que hemos construido durante este tiempo

A mis entrañables amigos Sebastián Miñaca, Luis Benalcazar, Fernando Paucar, Carolina Lara, Fernanda Cifuentes, Cristina Moreno, Rómulo Alvarado, Lenin Sabio, Miguel Cuellar, Luis Analuisa, Ramiro Pérez, Alberto Vásquez, Carolina Villareal, Cristina Iglesias Adriana Espinosa. Sofía Ortega, Karen Ferrari y demás personas que siempre estuvieron a mi lado.

A todos mis compañeros de la Carrera de Agroindustria y en especial a mis colegas de la Clase 2000.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

AL Zamorano, por darme la oportunidad de ser parte de esta hermosa Institución a través del apoyo económico brindado durante el programa de Agrónomo.

Al Banco del Pacífico, en especial a Sr. Marcel Laniado, por la beca otorgada durante el programa de Agrónomo.

A la Zamoempresa de Lácteos y Cárnicos, en especial a su gerente Óscar Sanabria por hacer posible la realización de esta tesis gracias al apoyo económico brindado.

Al Laboratorio Agrobiotek, en especial a la Dra. Jeannette Ayestas por la donación de algunas de las pruebas de ELISA utilizadas en la tesis.

A mis maravillosos padres por todo el sacrificio que han hecho para que pueda culminar mis estudios en Zamorano.

RESUMEN

Morales, J. 2002. Evaluación microbiológica de seis productos lácteos y seis productos cárnicos elaborados en Zamorano. Proyecto Especial del programa de Ingeniero Agrónomo. Zamorano, Honduras. 53 p.

Según la Organización Panamericana de la Salud, el 64% de las intoxicaciones e infecciones por alimentos en Latinoamérica son causados por bacterias. *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* son patógenos importantes asociados con enfermedades transmitidas por alimentos. Los métodos rápidos, como los ensayos de enzima ligada inmunsorbente (ELISA), son alternativas para evaluar la inocuidad de los alimentos. El objetivo fue evaluar la calidad microbiológica de seis productos lácteos: leche semi descremada, leche chocolate, helado, crema ácida, queso cabaña, queso crema, y seis cárnicos: jamón virginia, jamón de cerdo, salami imperial, mortadela, chorizo español y hot-dog, utilizando pruebas rápidas y cómputos en placa. Se analizaron tres muestras por producto durante tres semanas. Se utilizó el método rápido de ELISA del Sistema Reveal[®] (Neogen Inc.) para la detección de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria* spp. Las muestras positivas por *Salmonella* y *E. coli* O157:H7 se analizaron por métodos tradicionales hasta llegar a una identificación con el Sistema API 20E. En las pruebas de ELISA con productos lácteos se obtuvo una positiva (6%) para *Listeria* spp. en crema ácida. En los productos cárnicos se obtuvieron siete muestras positivas (39%) para *Listeria* spp. y tres se encontraron en el chorizo español. Una muestra de jamón virginia fue *Salmonella* spp. positiva. No se aisló *Salmonella*, pero se identificaron las bacterias *E. coli* y *Enterobacter cloacae*. Los cómputos para mesófilos aerobios y coliformes totales mostraron que la leche semi descremada y leche chocolate cumplen las normas establecidas. Las plantas requieren implementar o mejorar los programas de control. Se recomienda hacer un análisis en cada etapa del proceso de estos productos para identificar los puntos críticos y aplicar las medidas correctivas.

Palabras claves: ELISA, infección, inocuidad, intoxicación, microorganismo.

Nota de prensa

¿ SON INOCUOS LOS PRODUCTOS QUE CONSUME?

En Zamorano se realizó un estudio para evaluar la calidad microbiológica de seis productos lácteos: leche semi descremada, leche chocolate, helado, crema ácida, queso crema, queso cabaña y; seis productos cárnicos: jamón virginia, jamón de cerdo, salami imperial, mortadela, chorizo español y hot-dog, tomando como criterio de evaluación, la presencia de tres microorganismos patógenos importantes, y el cómputo en placa de unidades formadoras de colonias.

Los resultados de las pruebas de ELISA (Sistema Reveal) utilizadas, mostraron que estos productos están libres de *Salmonella* spp. y *E coli* O157:H7, que son bacterias capaces de causar graves enfermedades en el humano. Sólo una muestra de jamón virginia resultó presuntiva positiva para *Salmonella* spp., sin embargo, las bacterias aisladas e identificadas con las pruebas bioquímicas API 20E fueron *E. coli* y *Enterobacter cloacae*.

Una muestra de crema ácida resultó contaminada con *Listeria* spp., representando un 6% de incidencia del patógeno en productos lácteos. En cambio, en los productos cárnicos se obtuvieron siete muestras positivas para *Listeria*, tres de ellas pertenecientes al chorizo español. Esto representa un 39% de incidencia en los productos cárnicos. El jamón de cerdo fue el único producto cárnico que resultó libre de *Listeria* spp.

En los cómputos en placa, sólo la leche semi descremada y la leche chocolate cumplieron con las normas microbiológicas en todas las muestras analizadas; los demás productos resultaron con una carga microbiana elevada en alguna de sus muestras.

El estudio determinó que las Plantas de Zamorano necesitan implementar o mejorar los programas de control. Para ello se recomendó hacer un análisis en cada etapa del proceso de estos productos para identificar los puntos críticos y aplicar medidas correctivas.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Agradecimiento a patrocinadores.....	vi
Resumen.....	vii
Nota de prensa.....	viii
Contenido.....	ix
Índice de Cuadros.....	xii
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Anexos.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ANTECEDENTES.....	1
1.2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	2
1.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	2
1.4 LIMITANTES DEL ESTUDIO.....	3
1.5 OBJETIVOS.....	4
1.5.1 Objetivo general.....	4
1.5.2 Objetivos específicos.....	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.....	5
2.1.1 Definición.....	5
2.1.2 Problemas actuales relacionados con las ETA.....	6
2.2 DESCRIPCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EVALUADOS EN EL ESTUDIO.....	7
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	7
2.2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	8
2.2.3 <i>Salmonella</i> spp.....	9
2.3 ANÁLISIS Y CONTROL DE ALIMENTOS.....	11
2.3.1 Generalidades del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP).....	11
2.3.2 Generalidades de los métodos microbiológicos para análisis de Alimentos.....	12
2.3.2.1 Exactitud de los métodos microbiológicos.....	12
2.3.2.2 Precisión de los métodos microbiológicos.....	13
2.3.3 Métodos rápidos para detección e identificación de patógenos.....	13

3.	MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1	RECURSOS TÉCNICOS.....	15
3.1.1	Ubicación del estudio.....	15
3.1.2	Condiciones y equipamiento del laboratorio.....	15
3.2	PRODUCTOS EVALUADOS.....	16
3.3	TOMA DE MUESTRAS.....	16
3.4	METODOLOGÍAS MICROBIOLÓGICAS UTILIZADAS.....	17
3.4.1	Métodos rápidos de Ensayo Inmunsorbente de Enzima Ligada (ELISA)..	17
3.4.2	Cómputos estándares en placa.....	18
3.4.3	Investigación y aislamiento de <i>E. coli</i> en muestras positivas por prueba rápida del sistema Reveal®.....	18
3.4.4	Investigación y aislamiento de <i>Salmonella</i> spp. en muestras positivas por prueba rápida del sistema Reveal®.....	18
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1	PLANTA DE LÁCTEOS.....	19
4.1.1	Métodos rápidos de ELISA para detección de patógenos.....	19
4.1.2	Cómputos estándares en placa para el conteo microbiológico.....	20
4.1.2.1	Leche semi descremada.....	20
4.1.2.2	Leche chocolate.....	20
4.1.2.3	Helado.....	21
4.1.2.4	Crema ácida.....	22
4.1.2.5	Queso crema.....	22
4.1.2.6	Queso cabaña.....	23
4.2	PLANTA DE CÁRNICOS.....	24
4.2.1	Métodos rápidos de ELISA para detección de patógenos.....	24
4.2.1.1	Detección de <i>E. coli</i> O157:H7.....	24
4.2.1.2	Detección de <i>Listeria</i> spp.....	24
4.2.1.3	Detección de <i>Salmonella</i> spp.....	24
4.2.2	Cómputos estándares en placa para el conteo microbiológico.....	25
4.2.2.1	Jamón Virginia.....	25
4.2.2.2	Jamón de cerdo.....	26
4.2.2.3	Salami imperial.....	26
4.2.2.4	Mortadela.....	27
4.2.2.5	Chorizo español.....	27
4.2.2.6	Hot-dog.....	28
4.3	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS QUE DIERON RESULTADOS POSITIVOS POR ELISA.....	29
4.3.1	Planta de lácteos.....	29
4.3.2	Planta de cárnicos.....	30

4.3.2.1 Aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> O157:H7.....	30
4.3.2.2 Aislamiento e identificación de <i>Listeria</i> spp.....	30
4.3.2.3 Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp.....	31
5. CONCLUSIONES	32
6. RECOMENDACIONES	33
7. BIBLIOGRAFÍA	35
8. ANEXOS	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Resultados de las pruebas de ELISA en productos lácteos.....	19
2.	Cómputos estándares en placa para la leche semi descremada.....	20
3.	Cómputos estándares en placa para leche chocolate.....	21
4.	Cómputos estándares en placa para helado.....	21
5.	Cómputos estándares en placa para crema ácida.....	22
6.	Cómputos estándares en placa para queso crema.....	22
7.	Cómputos estándares en placa para queso cabaña.....	22
8.	Resultados de las pruebas de ELISA en productos cárnicos.....	25
9.	Cómputos estándares en placa de jamón virginia.....	26
10.	Cómputos estándares en placa de jamón de cerdo.....	26
11.	Cómputos estándares en placa de salami imperial.....	27
12.	Cómputos estándares en placa de mortadela.....	27
13.	Cómputos estándares en placa de chorizo español.....	28
14.	Cómputos estándares en placa de Hot-dog.....	28
15.	Características de bacterias importantes causantes de ETA.....	37
16.	Alimentos involucrados en brotes epidemiológicos.....	38
17.	Agentes etiológicos causantes de los brotes.....	38
18.	Locales de ocurrencia involucrados en los brotes.....	38
19.	Brotes según el tipo de agente.....	38
20.	Normas microbiológicas para cómputos estándares en placa.....	44
21.	Muestreo ambiental de la planta de lácteos.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Flujograma de ELISA para la detección de <i>E coli</i> O157:H7.....	40
2.	Flujograma de ELISA para la detección de <i>Listeria</i> spp.....	41
3.	Flujograma de ELISA para la detección de <i>Salmonella</i> spp.....	42
4.	Diagrama de flujo del método del Número Más Probable.....	46
5.	Diagrama de flujo del método convencional para aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.....	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1.	Bacterias asociadas con enfermedades transmitidas por alimentos.....	37
2.	Datos reportados por la Organización Panamericana de la Salud.....	38
3.	Pruebas de ELISA utilizadas para la detección de patógenos.....	39
4.	Procedimiento de ELISA para la detección de <i>E. coli</i> O157:H7.....	40
5.	Procedimiento de ELISA para la detección de <i>Listeria</i> spp.....	41
6.	Procedimiento de ELISA para la detección de <i>Salmonella</i> spp.....	42
7.	Procedimiento de los cálculos estándares en placa para la enumeración de microorganismos.....	43
8.	Normas establecidas por la División del Control de Alimentos del Ministerio de Salud de Honduras.....	44
9.	Procedimiento del Número Más Probable para el aislamiento de <i>E. coli</i> ..	45
10.	Procedimiento para el aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp....	47
11.	Muestra de crema ácida positiva para <i>Listeria</i> spp. con prueba de ELISA.....	48
12.	Análisis de ambiente de la planta de lácteos.....	48
13.	Muestras de productos cárnicos positivos para <i>Listeria</i> spp. con las pruebas de ELISA.....	49
14.	Distribución de los microorganismos patógenos en un alimento contaminado.....	49
15.	Aislamiento e identificación de la muestra de jamón virginia presuntiva positiva de <i>Salmonella</i> spp. con la prueba bioquímica API 20E.....	50
16.	Modelo de la etiqueta recomendada para el manejo apropiado del producto por parte del consumidor.....	52
17.	Resultado de confirmación de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestra de chorizo español.....	53

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

En la planta de lácteos de Zamorano se lleva un buen control de calidad de la leche cruda que ingresa como materia prima. Las pruebas que se realizan continuamente son las sensoriales: acidez titulable, porcentaje de grasa, gravedad específica, sólidos totales y sólidos no grasos. Se realizan también pruebas microbiológicas para recuento de mesófilos aerobios y coliformes totales.

La planta también cuenta con un plan basado en los principios de “Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control” (HACCP, sigla en inglés), para las líneas de proceso de leche pasteurizada y leche chocolate, lo cual ayuda a mantener la inocuidad en este producto. También, Romero (2000) realizó un estudio para el establecimiento de HACCP en los productos de helado y yogur, determinando la pasteurización como el único punto crítico del procesamiento del helado y la pasteurización junto con el envasado como los puntos críticos del procesamiento del yogur.

Además, se han realizado recuentos de mesófilos aerobios para otros productos terminados como el efectuado en el año 2000 en el cual los resultados mostraron que los productos elaborados en la planta cumplían con las normas microbiológicas establecidas para el cómputo de mesófilos aerobios totales.

En diciembre del 2001 se realizaron análisis microbiológicos para en el laboratorio de microbiología del “Centro de Evaluación de Alimentos” (CEA) a productos terminados elaborados en la planta de cárnicos. Los productos analizados fueron mortadela, chorizo español, jamón de cerdo, carne molida de res, salami y jamón virginia. Los análisis a cada producto incluyeron cómputo de coliformes totales, cómputo de *E. coli* y cómputo de *S. aureus*. Los resultados indicaron que los productos cumplían con las normas establecidas excepto en el caso de la carne molida de res.

En otro análisis realizado una semana posterior al de productos terminados por el CEA, se comprobó que algunos de los equipos de la planta de cárnicos presentaban un número elevado de coliformes totales y de mesófilos aerobios. También la sala de procesamiento, sacrificio y el salón de enseñanza mostraron niveles arriba de lo aceptable

en el cómputo de mesófilos aerobios y coliformes totales; en especial el salón de enseñanza debido al inadecuado diseño del techo por donde se puede dar el ingreso de polvo. Esto va en detrimento de la calidad de los productos terminados ya que están expuestos a cantidades altas de microorganismos.

En cuanto a la detección de microorganismos patógenos específicos en productos terminados listos para el consumo, no se realiza un control rutinario en ninguna de las dos plantas, lo cual dificulta conocer la inocuidad de dichos productos y aumenta el riesgo de poner en el mercado un producto no apto para el consumo.

1.2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La Zamoempresa de Lácteos y Cárnicos no es sólo un lugar de enseñanza práctica para los alumnos de la Institución. Es una empresa que busca un mejoramiento continuo de sus productos para competir en un mercado más amplio y a la vez más exigente. Sin embargo, este cambio no sólo implica optimizar los procesos de producción sino que incluye adoptar normas de control de calidad más estrictas.

Las Plantas de Lácteos y Cárnicos trabajan dentro de lo posible bajo un sistema de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), pero para implementar un sistema HACCP se requiere de un esfuerzo continuo que complemente las BPM y los Procedimientos Estándares de Operación (PEO) que se están aplicando.

A pesar de la gran diversidad de microorganismos capaces de causar “Enfermedades Transmitidas por Alimentos” (ETA), el presente estudio está dirigido hacia la investigación y detección de la presencia de tres géneros de bacterias en seis productos elaborados en la planta de lácteos y cárnicos de Zamorano.

1.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Es necesario contribuir a la gradual implementación de sistemas de control de calidad que garanticen la inocuidad de los alimentos elaborados en Zamorano en beneficio de la salud del consumidor.

Determinar la presencia de estos patógenos en los alimentos es de suma importancia cuando estamos considerando la inocuidad como un factor que afecta la calidad de los productos y que tiene serias implicaciones como riesgo para la salud humana. Sin embargo, la detección de estos microorganismos por métodos tradicionales es muy complicada ya que requiere de medios selectivos, gran cantidad de equipo de cristalería, se necesita un lugar adecuado para asegurar que las muestras y diluciones no se contaminen y lo más importante, requiere como mínimo 5 días para obtener los resultados. Por tanto el método convencional se convierte en un método ineficaz para las empresas alimentarias que no pueden retener sus productos hasta que se obtengan los resultados de los análisis, especialmente si estos productos son perecederos.

Esta necesidad por identificar los microorganismos presentes en los alimentos ha llevado a que grandes compañías desarrollen métodos rápidos de detección para ser usados en la industria de alimentos. Es así, que ahora las técnicas basadas en inmunología o en biología molecular como el de Ensayo Inmunosorbente de Enzima Ligada (ELISA, siglas en inglés) y la Reacción en cadena de Polimerasa (PCR, siglas en inglés) respectivamente, son herramientas útiles en el control de calidad de los productos.

Según Porta (1999), los métodos tradicionales para detección de microorganismos patógenos, especialmente *Salmonella*, en condiciones normales de muestreo tienen 70% de efectividad. Es decir, dan 30% de falsos resultados negativos, mientras que las técnicas de ELISA tienen una fiabilidad muy próxima al 100%, lo cual permite implementar un programa de monitoreo y control estricto que facilita el uso de dos herramientas básicas: el análisis estadístico y el método de diagnóstico eficaz. Sin embargo, según Gunther (1990), se recomienda que todas las pruebas positivas de ELISA sean confirmadas posteriormente mediante métodos de cultivo clásicos.

Escherichia coli 0157:H7, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* han sido asociados con importantes brotes de ETA en Estados Unidos y en Latinoamérica. Por esta razón, el estudio fue enfocado en estos tres géneros.

1.4 LIMITANTES DEL ESTUDIO

Los métodos rápidos para detección de microorganismos patógenos son más eficientes que los métodos tradicionales y son una herramienta de gran utilidad cuando se implementa un sistema exigente de control de calidad. Sin embargo estas pruebas son más costosas que los métodos convencionales. Por ello el número de análisis que se realizó en el estudio fue reducido debido al limitado presupuesto asignado. Esto también determinó a que solo se evalúe la calidad final del producto dejando de lado los análisis dentro del procesamiento, por tanto los resultados obtenidos fueron muy generales pero servirán de base para futuras investigaciones

En caso de obtener resultados positivos en los análisis con las pruebas de ELISA, solo se podrá hacer pruebas bioquímicas confirmatorias para *Salmonella* y para *E. coli*. En el caso obtener resultados positivos de *Listeria*, no se podrá hacer pruebas confirmatorias ya que no se dispone de los medios de cultivo selectivos necesarios en el CEA. Sin embargo, se recurrió a un laboratorio externo para confirmar por lo menos una de las muestras positivas obtenidas

Además de los análisis para la detección de los tres tipos de patógenos por medio de ELISA, se realizaron los análisis de rutina tales como recuento total de mesófilos, recuento de coliformes y recuento de hongos por medio de métodos tradicionales con el fin obtener una mejor evaluación microbiológica de los seis productos lácteos y seis productos cárnicos utilizados en el estudio.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Evaluar la calidad microbiológica de seis productos elaborados tanto en la planta de lácteos como en la planta de cárnicos de Zamorano y determinar si estos productos cumplen con las normas microbiológicas establecidas en Honduras.

1.5.2 Objetivos específicos

- Utilizar métodos rápidos (Sistema Reveal[®], Neogen) para detectar microorganismos patógenos específicos como *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. en los productos seleccionados para la investigación.
- Evaluar la calidad microbiológica de los diferentes productos por medio de las pruebas de cómputo total de mesófilos o psicrófilos aerobios, análisis de microorganismos indicadores como el cómputo de coliformes totales y cómputo de mohos y levaduras.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

2.1.1 Definición

Según Miller (1998), ETA se llaman a aquellas enfermedades que se generan por el consumo de alimentos que contienen una cantidad suficiente de microorganismos patogénicos, o de sus toxinas, que afectan a la salud del individuo.

Una intoxicación se presenta cuando el microorganismo responsable se multiplica en el alimento produciendo y liberando al medio una toxina que al ser ingerida produce la enfermedad. En cambio, la infección se presenta cuando el microorganismo causal es ingerido causando un proceso patológico determinado requiriendo de un mayor tiempo para la manifestación de síntomas en el individuo.

La intoxicación ocurre cuando las enterotoxinas producidas por el crecimiento de microorganismos en el alimento, son ingeridas y afectan directamente al cuerpo humano. Estas toxinas pueden ser termo lábiles como en el caso de la toxina producida por *Clostridium botulinum*, o termo estables como en el caso de la producida por *Staphylococcus aureus* (Miller, 1998).

Las infecciones pueden presentarse de tres maneras. Una ocurre cuando el microorganismo ingerido penetra la mucosa intestinal y coloniza el tracto gastrointestinal produciendo un efecto negativo en el cuerpo humano; este tipo de patógenos pertenecen al género de la *Salmonella*, *Shigella*, y algunas cepas enteropatógenicas de *Escherichia coli*. Otra forma de infección es cuando el microorganismo viaja del tracto gastrointestinal hacia otros tejidos del cuerpo, por ejemplo la *Trichinella spiralis* que ataca el tejido muscular. El último tipo de infección ocurre cuando se liberan toxinas en el tracto intestinal debido a la multiplicación del microorganismo ingerido; este tipo de infección es causado por *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens* algunas cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli*.

Las ETA son producidas por bacterias, virus, hongos y parásitos. Entre las principales bacterias responsables de estas alteraciones están: *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, distintas especies de *Salmonella*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, especies del género *Shigella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Compylobacter spp* (Marth, 1986) (Anexo 1).

2.1.2 Problemas actuales relacionados con las ETA

Según Kaferstein *et al.* (1999), las ETA son causadas por un amplio rango de microorganismos y la severidad de estas enfermedades puede variar desde un simple malestar hasta una enfermedad crónica con tratamiento de por vida. Esto representa un serio problema ya que su verdadera incidencia en la salud pública y sus consecuencias económicas no son completamente apreciadas debido a que sólo un pequeño porcentaje de casos son reportados a los centros de salud y de ellos, un pequeño grupo de casos son investigados. En los países desarrollados menos del 10% de los casos son reportados, sin embargo este porcentaje esta aumentando; mientras que en los países en desarrollo el número de casos reportados no llega al 1%.

Según la Organización Panamericana de la Salud, desde el año 98 hasta el 2001 se produjeron en Latinoamérica 1,891 brotes que afectaron a 64,248 personas, de los cuales 68 personas fallecieron. Los alimentos principales relacionados con estos brotes fueron el agua, las carnes rojas, pescados, lácteos, huevos y hortalizas, de los cuales los lácteos produjeron el 38.71% de las muertes. Además, de todos los agentes etiológicos, las bacterias causaron el 66.44% de los brotes de estas enfermedades (Anexo 2).

Miller (1998) sostiene que los países industrializados también han experimentado un aumento en el número de epidemias provocadas por estos microorganismos y algunas de las razones de este aumento pueden ser:

- Mejores métodos de detección e identificación han contribuido a aumentar el número de casos reportados.
- El estilo de vida puede estar incidiendo sobre el número de casos presentados debido a que la gente come más fuera de casa, esta constantemente viajando, y consume con más frecuencia platos exóticos.
- A medida que la gente se aleja del conocimiento del manejo correcto de los alimentos, ellos desarrollan técnicas incorrectas del manejo de los mismos.
- Las tendencias alimenticias de consumir alimentos provenientes de restaurantes, y en forma preparada y refrigerada, implica que el alimento debe ser manipulado por más personas antes de que llegue al consumidor final. Esto aumenta el riesgo de contaminación del alimento ya sea por una manipulación incorrecta del mismo o por un inadecuado manejo de la temperatura.
- Muchos productos nuevos son diseñados para que el consumidor los conozca como alimentos sin aditivos. Estos pueden ser pasteurizados y almacenados bajo atmósfera controlada. Pero si ellos no son bien manejados en algún punto. Esporas termo resistentes pueden sobrevivir y proliferarse y producir enfermedades.
- Los microorganismos están desarrollando cepas resistente a antibióticos lo cual contribuya al incremento de incidencias de estos patógenos y dificulta el control de los mismos.

Enfermedades como la Listeriosis y Toxiplasmosis son particularmente peligrosas durante el embarazo ya que pueden ser fatales para el feto o causar severas deformaciones al mismo. Kaferstein *et al.*, (1999) sostienen que estos niños corren un riesgo congénital cerebral y daños oculares muy severos. Estas enfermedades pueden producir daños

crónicos como desorden del sistema inmunológico, enfermedades cardiovasculares, desordenes en el sistema renal e incluso la posibilidad de cáncer.

En países en desarrollo una de las principales implicaciones que tienen las ETA es el efecto en el estatus nutricional de infantes y niños. Las diarreas ocasionadas por estos microorganismos pueden conducir a la desnutrición que en casos severos provoca un deterioro del sistema inmune o debilitamiento del cuerpo para resistir ataques futuros de diarreas y otras enfermedades infecciosas. Muchos de estos niños no pueden resistir al círculo vicioso creado entre la infección y malnutrición.

El problema de alimentos contaminados, al igual que el crecimiento de microorganismos patógenos es fuertemente agravado por la falta de conocimiento acerca de las medidas básicas de alimentos seguros, mala cocción de los alimentos e inadecuadas condiciones de almacenamiento. Además, el rápido incremento poblacional combinado con la migraciones masivas a las áreas urbanas, han llevado a la formación de centros urbanos de alta densidad poblacional en muchos países. Este incremento en la población urbana ha ocurrido más rápido que el desarrollo de infraestructura relacionada a la salud, incluyendo la sanidad básica, e inevitablemente ha llevado a un incremento del riesgo en cuanto a contaminación de los alimentos y agua (Kaferstein *et al.*, 1999).

2.2 DESCRIPCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EVALUADOS EN EL ESTUDIO

2.2.1 *Escherichia coli*

Es un bacilo gram-negativo, residente del intestino de animales de sangre caliente. Por mucho tiempo se utilizó a este microorganismo como un indicador de la sanidad de los alimentos, pero luego se descubrió la existencia de cepas capaces de causar enfermedades entéricas. En efecto, este tipo de *E. coli*, es ahora conocida como el agente etiológico causal de diarrea y enfermedades gastrointestinales en países en desarrollo y en otras áreas con pobres condiciones sanitarias (Miller, 1998).

Algunos serotipos de *E. coli* pueden sobrevivir a períodos prolongados de refrigeración pero son muy sensibles a inactivación por calor. La refrigeración de carnes precocidas se ha identificado como un a forma de manejo eficiente para reducir el riesgo de infección por este microorganismo.

Según Miller (1998), los síntomas varían significativamente y dependen del tipo de *E. coli* patogénico. Cuatro tipos han sido identificados:

- *E. coli* enteropatógenicas (EPEC) causan un repentino ataque con severos calambres abdominales, postración de la persona y diarrea sanguinolenta.
- *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC) produce toxinas que causan de una leve a severa diarrea con profunda deshidratación y conmoción sin fiebre. Ciertas toxinas termo-lábiles y termo-estables pueden ser encontradas en este tipo.

- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) penetra el epitelio y causa fiebre, escalofrío, dolor de cabeza, dolores musculares, calambres abdominales, y una diarrea pálida y profusa.
- *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) causa cambios en el colon, similares a los de colitis. La verocitotoxina es el agente causal y resulta en una diarrea sanguinolenta y severos dolores abdominales. En algunos casos puede producir el Síndrome hemolítico urémico. Puede presentarse vómito y el síndrome usualmente demora siete días en adultos pero es mas largo en niños. Sin embargo la toxina puede crear una situación de tratamiento de por vida (Miller, 1998).

Según Notermans y Mead (1999) de todos los serotipos de *E. coli* capaces de producir la verocitotoxina el más importante es el *E. coli* O157:H7 el cual se puede encontrar en una gran cantidad de alimentos especialmente en carnes de res con cocción incompleta, leche y jugos no pasteurizados, salami, lechuga, yogur, emparedados, agua entre otros.

Los síntomas iniciales causados por *E. coli* O157:H7 generalmente ocurren uno o dos días después de ingerir el alimento contaminado. Éstos comienzan con una leve diarrea sin sangre que puede ser seguida de moderados dolores abdominales y una leve fiebre. La diarrea incrementa en intensidad durante las siguientes 24 a 48 horas y pasa a una fase de diarreas sanguinolentas acompañado de severos dolores abdominales y deshidratación por un periodo de 4 a 10 días. El síndrome hemolítico urémico se puede presentar aproximadamente una semana después de los síntomas gastrointestinales y sus síntomas característicos son la destrucción de glóbulos rojos en la sangre (anemia hemolítica angiopática), disminución del contenido de plaquetas en la sangre (trombocitopenia), pérdida de la formación de orina (oligo-anuria), y una falla renal aguda (Buchanan y Doyle, 1997).

Se están desarrollando nuevos medios de cultivo para aislar *E. coli* O157:H7 y estos medios incluyen sales de bilis y antibióticos para proveer selectividad al medio. Los métodos usuales no son eficientes para aislar este serotipo ya que tiene un crecimiento pobre a 44°C (Notermans y Mead, 1999).

2.2.2 *Listeria monocytogenes*

Es un bacilo Gram-positivo no esporulado. La *Listeria monocytogenes* es una bacteria telúrica, muy extendida en el ambiente. Es muy resistente al medio exterior, pudiendo sobrevivir varios años a 4°C. Es huésped de seres vivos, encontrándose de 5 a 30% en el intestino de los animales y humanos. También, se encuentra en los peces y los invertebrados.

La *L. monocytogenes* es una bacteria que se desarrolla bien entre -2.5 y los 4°C. La congelación (-15°C) no la destruye pero sí detiene su crecimiento. Es resistente a medios ácidos por lo que su crecimiento puede darse a pH bajo. Tiene también cierta resistencia a los nitritos, pero puede ser destruída con la pasteurización. Es aero-anaerobia facultativa (Marth, 1986).

Es el agente causante de la Listeriosis, enfermedad común en el hombre y en numerosas especies animales. Es responsable de producir abortos, septicemias y meningitis. La infección se produce esencialmente por vía digestiva. Las personas más sensibles son las mujeres embarazadas, los recién nacidos, las personas de edad avanzada y los que hayan tenido una disminución de sus defensas inmunológicas como los enfermos de cáncer, leucemia, diabetes y ciertas enfermedades renales.

Todos los alimentos son potencialmente sospechosos. Particularmente, los vegetales crudos, las carnes rojas, pescado, salsas, leche entera, leche con chocolate, quesos blandos, quesos fermentados, productos lácteos que no han recibido un proceso de pasteurización y todos los alimentos que se comercializan listos para consumir.

Esta muy bien establecido que cualquier producto fresco de origen animal o vegetal puede albergar un número variable de *L. monocytogenes*. La prevalencia de este organismo en leche y productos lácteos ha recibido atención debido a brotes epidémicos. En un estudio realizado en Holanda en 1988, 4.6% de 829 muestras de queso blando elaborados a partir de leche cruda fueron positivas para *Listeria monocytogenes* (Jay, 2000).

L. monocytogenes es muy importante en alimentos congelados listos para consumir, por esta razón se ha buscado métodos para identificar y aislar este microorganismo. Su aislamiento es particularmente difícil en el caso de alimentos que tienen una alta contaminación con otros microorganismos lo que usualmente lleva a una inadecuada siembra de este patógeno. Uno de los métodos más cortos incluye la incubación en un cultivo enriquecido con nutrientes por más de seis meses a cuatro grados centígrados para promover el crecimiento de *Listeria* a expensas de microorganismos competidores. Sin embargo este sistema es demasiado lento para ser incorporado como un método de análisis rutinario para alimentos. Hoy en día varios medios conteniendo agentes selectivos como ácido nalidíxico y acriflavina permiten al cultivo ser incubado a altas temperaturas por períodos mucho más cortos. La selectividad de estos medios puede ser favorecida por subcultivos dentro de un segundo medio enriquecido (Notermans y Mead, 1999).

2.2.3 *Salmonella* spp.

Es un bacilo gram-negativo, no esporulado, generalmente móvil debido a los flagelos periféricos, aunque pueden existir cepas inmóviles.

La temperatura óptima de crecimiento en condiciones experimentales es de 37°C. El pH del substrato, así como el tiempo de incubación, influyen en la temperatura de crecimiento, éstas se dan a un pH de 7 a 8 (Marth, 1986).

El mayor reservorio de esta bacteria, es el tracto intestinal de los animales. La *Salmonella* puede permanecer en muchos alimentos debido a su simple requerimiento nutricional y a la gran habilidad para crecer en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Sin embargo este microorganismo tiene un amplio rango de pH y temperatura a la cual puede sobrevivir.

Los alimentos asociados con esta bacteria son: carnes crudas, leche y productos lácteos, pescado, camarones, aves de corral, huevos, ensaladas, coco, cacao, chocolate. Otros

alimentos relacionados con este patógeno son: ensaladas, sandwiches, bocaditos de carne y salsas recalentadas.

Salmonella es encontrado en una gran variedad de productos cárnicos debido a la contaminación cruzada que se puede dar por la inadecuada desinfección de los equipos y utensilios utilizados en el proceso de estos productos (Miller, 1998).

La enfermedad causada por esta bacteria se llama Salmonellosis, pero existen tres tipos de esta enfermedad:

- **Fiebre entérica.** El ejemplo clásico es la fiebre Tifoidea. El período de incubación es de 7 a 14 días. La sintomatología comienza con malestar, anorexia y dolor de cabeza, seguido por una fiebre que paulatinamente va subiendo hasta alcanzar los 40°C. El pulso se hace más lento a medida que la fiebre aumenta produciéndose con frecuencia hemorragias nasales.

Durante la primera semana existe un estado de postración del enfermo, acompañado a veces de diarrea aunque es más común el estreñimiento. En las primeras dos semanas es también común la aparición de manchas rosáceas en la piel y la temperatura alta se mantiene. En casos graves el paciente entra en un estado de delirio.

En algunos casos la *Salmonella* permanece en los tejidos del hospedador después de la recuperación constituyéndose en portador. El 3% de los casos eliminan *S. typhi* por las heces durante más de un año después de la recuperación. El estado de portador es menos frecuente con *S. paratyphi* y su duración es mucho más corta (Marth, 1986).

- **Gastroenteritis.** Este tipo de Salmonellosis tiene un período de incubación de 3 a 72 horas después de la ingestión del producto contaminado. Los síntomas de esta enfermedad son: náuseas, vómito, dolores abdominales y diarreas que normalmente aparecen de forma repentina. Estos síntomas suelen ir precedidos de dolor de cabeza y escalofríos. Otros síntomas relacionados con esta enfermedad son: heces acuosas, verdosas y de olor insoportable, postración, debilidad muscular, desfallecimientos, fiebre moderada, intranquilidad, crispación y somnolencia (Marth, 1986).
- **Septicemia.** Se caracteriza por fiebre alta remitente y por la presencia de los microorganismos en la sangre. Con este tipo de enfermedad los patógenos se puede localizar en cualquier tejido del cuerpo produciendo abscesos localizados en las regiones pélvica y perineal, colecistitis, pielonefritis, endocarditis, meningitis, artritis y neumonía. Uno de los microorganismos más encontrados en este tipo de enfermedad es *S. choleraesuis* La mortalidad en este tipo de Salmonellosis es del 5 al 20% (Miller, 1998).

2.3 ANÁLISIS Y CONTROL DE ALIMENTOS

2.3.1 Generalidades del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP)

El HACCP entró en el área de la inocuidad de alimentos al ser desarrollada de manera conjunta entre la Administración para la Aeronáutica y el Espacio (NASA), laboratorios del Ejército de los Estados Unidos y la Compañía Pillsbury quienes a comienzos de los años 70, iniciaron su aplicación en la producción de alimentos con requerimientos de “cero defectos” destinados a los programas espaciales de la NASA. En 1971 el sistema fue oficialmente presentado durante la primera Conferencia Nacional de Protección de Alimentos en Estados Unidos (Pearson y Dutson, 1996).

El sistema HACCP es una filosofía cuyo objetivo principal es garantizar la inocuidad de los alimentos para el ser humano. Se diferencia de los métodos clásicos que en lugar de simplemente corregir los problemas después de su ocurrencia, HACCP los anticipa procurando evitar su incidencia en la medida de lo posible, o manteniendo el peligro dentro de parámetros aceptables para la salud del consumidor. Por tanto HACCP es un sistema preventivo mientras que los otros son correctivos (Corlett, 1998).

La información sobre las características de crecimiento y sobrevivencia de los microorganismos patógenos son de muchísima importancia para el establecimiento de los puntos críticos de control o para el diseño de la línea de proceso para un producto alimenticio seguro.

Los métodos rápidos para detección de patógenos son muy utilizados dentro de HACCP especialmente en el desarrollo de información para una apropiada evaluación del riesgo, para evaluar desviaciones y hace correcciones y en la verificación de los procesos incluyendo chequeo del producto, determinando efectos de cambio y monitoreando a los proveedores. Además, estos métodos son usados indirectamente para determinar los puntos críticos de control y pueden ser utilizados en la evaluación de la eficacia de la limpieza (Fung, 1995).

En Estados Unidos, el Servicio de Alimentos Seguros e Inspección (FSIS, sigla en inglés) está continuamente proveyendo sistemas mejorados que ayuden a garantizar la inocuidad de los alimentos. El primer paso importante para alcanzar esta meta se logro en julio de 1996 con la publicación del registro federal de la regulación final para la reducción de patógenos y sistemas HACCP. Esta regulación requiere que las plantas implementen sistemas de control basados en procesos científicos como un medio de prevenir riesgos,

establecer estándares para la inocuidad del alimento, y establecer programas de evaluación que aseguren el cumplimiento de esos estándares. Bajo HACCP, las plantas identifican y evalúan los peligros sobre la seguridad del alimento que podrían afectar sus productos y establecen controles necesarios para prevenir esos peligros o para mantenerlos dentro de límites aceptables.

2.3.2 Generalidades de los métodos microbiológicos para análisis de alimentos

Generalmente, la cantidad exacta de microorganismos presentes en un alimento contaminado es desconocida, y el número de organismos detectables dependerá de las características del método utilizado. La mayoría de los métodos analíticos utilizados para la detección de microorganismos en alimentos están basados en el uso de cultivos selectivos. La selectividad es obtenida por los agentes químicos que son adicionados al medio de aislamiento y por las condiciones apropiadas para dicho cultivo (incubación, temperatura, atmósfera). Estos factores permiten el crecimiento del organismo estudiado y al mismo tiempo suprime el crecimiento de otros. Pero, no todos los microorganismos indeseados en ese cultivo son inhibidos y alguno de ellos puede afectar las reacciones típicas del organismo que estamos estudiando. Por esta razón son muy necesarias las pruebas confirmatorias (Notermans y Mead, 1999).

2.3.2.1 Exactitud de los métodos microbiológicos. La exactitud de un método envuelve los siguientes aspectos:

- Recuperación del microorganismo requerido. El estado fisiológico de una bacteria en el alimento puede variar desde un microorganismo completamente viable hasta uno muerto, incluyendo organismos lesionados (incapaces de crecer en el cultivo) e incluso organismos viables pero no cultivables en medios convencionales. La proporción de microorganismos recuperados en un medio puede ser muy diferente para una población lesionada en comparación con la recuperación de una población cuyas células son mayormente viables. Por tanto la forma más directa de evaluar la recuperación que tiene un medio es a través del análisis de una o más suspensiones puras del organismo para el cual se utiliza dicho medio. Algunos tipos importantes de lesión pueden ser inducidos para imitar el estado fisiológico de los microorganismos en el alimento. Estas lesiones dependen del tipo de alimento e incluye daños causados por calentamiento, secado, acidificación entre otros.
- Capacidad inhibidora. La detección específica de ciertos microorganismos usualmente depende de las condiciones selectivas y de las sustancias inhibidoras incorporadas al medio de aislamiento. La capacidad inhibidora está dirigida hacia los microorganismos indeseables en ese cultivo y esto no debería tener un efecto adverso sobre el organismo buscado.

- Sensibilidad y especificidad. La sensibilidad de un método puede ser definida como la proporción del microorganismo de interés que puede desarrollarse bajo las condiciones del método y dar reacciones características del mismo. La especificidad es reflejada en la proporción de organismos no deseables que dan una reacción. Se debe seleccionar métodos con alta sensibilidad y especificidad. Si la especificidad es baja las pruebas confirmatorias se vuelven esenciales (Notermans y Mead, 1999).

2.3.2.2 Precisión de los métodos microbiológicos. Los principios generales para determinar la precisión de los métodos microbiológicos están dados por dos parámetros importantes:

- Repetibilidad. Es definida como la aproximación entre los resultados obtenidos por el mismo método y usando material idéntico dentro del mismo laboratorio y realizado por la misma persona y con el mismo equipo.
- Reproducibilidad. Es definida como la aproximación entre los resultados obtenidos con el mismo método en material idéntico, pero en diferentes laboratorios y realizados por diferentes personas usando su propio equipo (Notermans y Mead, 1999).

2.3.3 Métodos rápidos para detección e identificación de patógenos

La necesidad de desarrollar métodos rápidos para detección, identificación y enumeración de microorganismos en alimentos es cada vez mayor. Estos métodos ayudan a reducir el tiempo para la obtención de resultados y son más fáciles de realizar, que la mayoría de métodos tradicionales. Muchos métodos rápidos de detección e identificación han sido desarrollados y puestos en el mercado, mientras que los métodos para la enumeración son más limitados.

La microbiología clínica inició el uso de los métodos rápidos en los años 60 y pero se aceleró su uso en los años 70. Esto resultó en el desarrollo y comercialización de kits y sistemas de diagnóstico los cuales hoy en día son usadas como pruebas de rutina. Técnicas más recientes como ELISA, sistema de PCR, pruebas de ADN/ARN han sido estudiadas y aplicadas a una gran variedad de pruebas microbiológicas.

La microbiología de alimentos empezó su desarrollo 10 años después de la clínica pero en los años 90 estuvo a pocos pasos de ésta y se presume que pronto la microbiología de alimentos estará a la par de la clínica debido a los grandes esfuerzos de los países industrializados por utilizar estas tecnologías en la industria de alimentos (Fung, 1995).

Los métodos inmunológicos para detección de patógenos están basados en la formación de anticuerpos los cuales son sustancias complejas formadas por el contacto con un material foráneo llamado antígeno. El desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos contra específicas fracciones antigénicas del microorganismo o su toxina han permitido la aplicación de varias técnicas in el campo de la microbiología de alimentos. Estos tipos de

reacciones inmunológicas usados en análisis microbiológicos incluyen: immuno-difusión, aglutinación, inmunofluorescencia, inmuno ensayos de enzima (EIA, sigla en inglés) y ELISA (Giese, 1995).

El método de ELISA más conocido es el de “sandwich” (porque el antígeno queda atrapado entre dos moléculas de anticuerpo) es uno de los métodos mas usados. Los anticuerpos pueden tener la misma especificidad o pueden estar dirigidos a diferentes sitios antigénicos en el microorganismo. La presencia del microorganismo en la muestra analizada produce una reacción antígeno-anticuerpo, que es visualizada a través del cambio de color producido por la enzima ligada al anticuerpo la cual es liberada al producirse dicha reacción (Giense, 1995).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 RECURSOS TÉCNICOS

3.1.1 Ubicación del estudio

El estudio se realizó con el objeto de evaluar la condición microbiológica de seis productos perteneciente a las plantas de lácteos y cárnicos de la zamoempresa ZELACA en el Zamorano (valle del Yeguaré, Honduras). Los análisis de estos productos se llevaron a cabo en el laboratorio de microbiología del CEA en Zamorano.

3.1.2 Condiciones y equipamiento del laboratorio

Este laboratorio se encuentra a poca distancia de las plantas de lácteos y cárnicos, lo cual facilitó el traslado de las muestras.

Posee el equipo y los materiales indispensables tales como:

- Autoclave
- Bolsas estériles
- Balanza de precisión
- Calentador para baño maría.
- Cámara de flujo laminar
- Equipo de cristalería estéril:
 - Platos de Petri
 - Pipetas
 - Erlenmeyers
 - Frascos de dilución
- Homogeneizador de muestras (“Stomacher”)
- Incubadoras
- Medios de cultivo
- Microscopio
- Pinzas, cuchillos y cucharas estériles
- Solución diluyente (Buffer de fosfato o agua peptonada al 0.1 %)
- Termómetros

3.2 PRODUCTOS EVALUADOS

Para la evaluación microbiológica se escogieron seis productos pertenecientes a cada una de las plantas mencionadas. La elección de estos productos se realizó consultando a los gerentes de cada planta quienes propusieron los productos sobre los cuales ellos tenían mayor interés.

El estudio se dividió en dos etapas, las cuales fueron asignadas a cada una de las plantas. La primera se realizó en la planta de Lácteos y la segunda en la planta de Cárnicos.

Los productos a ser evaluados fueron los siguientes:

Etapas I Lácteos:

- Leche pasteurizada
- Leche chocolate
- Helados
- Crema ácida
- Queso Cabaña
- Queso Crema

Etapas II Cárnicos:

- Jamón Virginia
- Jamón de cerdo
- Salami imperial
- Mortadela
- Chorizo español
- Hot-dog

Las variables que se evaluaron en cada uno de estos productos fueron:

- Presencia de *E. coli* O157:H7.
- Presencia de *Listeria* spp.
- Presencia de *Salmonella* spp.
- UFC/ml o g de mesófilos aerobios totales.
- UFC/ml o g de coliformes totales.
- UFC/ml o g de mohos y levaduras.
- UFC/ml o g de psicrófilos.

3.3 TOMA DE MUESTRAS

La muestra consistió en el producto terminado y empacado, listo para ser comercializado, el cual fue obtenido del último lote producido al momento de realizar el análisis. Este producto fue elegido al azar del total de unidades producidas en ese lote.

Cada producto seleccionado se analizó por un período de tres semanas. Al ser seis productos por planta, se analizaron 18 muestras por planta resultando un total de 36 muestras entre ambas plantas.

La muestra de cada producto fue recolectada e inmediatamente transportada al laboratorio para ser mantenida en condiciones de refrigeración a 4°C hasta el momento de efectuarse el análisis del mismo.

Los análisis se realizaron, dentro de las 24 horas después de recolectar la muestra. La muestra de cada producto se recolectó y analizó semanalmente dando como resultado seis muestras analizadas por semana.

La planta de lácteos trabaja utilizando un sistema calendarizado y continuo de producción, lo cual facilitó la toma de muestras durante la semana. En cambio, la planta de cárnicos trabaja en base a pedidos por lo tanto las semanas de muestreo no fueron consecutivas ya que los productos no estuvieron disponibles semanalmente. Los análisis se realizaron con una semana de por medio para tener disponibilidad de productos.

3.4 METODOLOGÍAS MICROBIOLÓGICAS UTILIZADAS

3.4.1 Métodos rápidos de Ensayo Inmunsorbente de Enzima Ligada (ELISA)

Los métodos rápidos basados en la técnica de ELISA fueron utilizados para detectar los microorganismos patógenos descritos anteriormente. Para la realización de los análisis se siguieron las instrucciones proporcionadas en el manual para el usuario proporcionada por la compañía productora de dichas pruebas.

Para la detección de microorganismos patógenos se utilizó:

- Dos cajas completas de Pruebas de ELISA tipo Reveal[®] para *Listeria monocytogenes*, con 20 pruebas cada uno.
- Dos cajas completas de Pruebas de ELISA tipo Reveal[®] para *Salmonella*, con 20 pruebas cada uno.
- Dos cajas completas de Pruebas de ELISA tipo Reveal[®] para *E. coli* O157:H7 con 20 pruebas cada uno.
- Sistema API 20E (la cual consiste en las pruebas bioquímicas para identificación de enterobacterias).

Las pruebas de ELISA utilizadas en el estudio pertenecen al sistema Reveal[®] de la casa comercial Neogen, cuyo distribuidor oficial en Honduras es el Laboratorio Agrobiotek.

El método de ELISA es específico para el patógeno que se investiga, por tanto cada caja contiene los cultivos selectivos apropiados para asegurar el crecimiento del patógeno en caso de que éste se encuentre presente en la muestra (Anexo 3).

El sistema viene equipado con un dispositivo especial para detectar la presencia o ausencia del microorganismo investigado. Una muestra del cultivo enriquecido se coloca en el puerto redondo del dispositivo de detección. El inóculo se difunde a través de la membrana hacia una zona de reacción que contiene anticuerpos del microorganismo específico marcados con oro coloidal (para *E. coli* y *Salmonella*) o con látex azul (para *Listeria*). Cada bacteria forma un complejo con los anticuerpos marcados y migra a través del dispositivo hasta encontrar una segunda línea de anticuerpos específicos para el mismo microorganismo. Cuando esto ocurre, una línea aparece en la ventana de la prueba (zona T) debido a la concentración de oro ligado en esta zona. También, se debe

desarrollar una línea de control la cual asegura que la prueba esta trabajando correctamente, siendo equivalente a un control positivo incorporado. Los procedimientos para cada uno de los microorganismos están descritos en los anexos 4, 5 y 6.

3.4.2 Cómputos estándares en placa

Los recuentos de mesófilos aerobios totales, coliformes totales, hongos y psicrófilos fueron realizados de acuerdo a los métodos tradicionales seleccionándose la técnica de “Pour Plate” (Vaciado en placa), descrito en el Compendio de métodos para el análisis microbiológico de alimentos (Vanderzant y Splittstoesser, 1992), (Anexo 7).

Los recuentos microbiológicos fueron comparados con las normas fijadas por la División de Control de Alimentos del Ministerio de Salud Pública de Honduras (Anexo 8).

Los medios de cultivo utilizados en el análisis fueron:

- Agar Métodos Estándar
- Agar Papa Dextrosa
- Agar Violeta Rojo Bilis

3.4.3 Investigación y aislamiento de *E. coli* en muestras positivas por prueba rápida del sistema Reveal®

Para el aislamiento de *E. coli* se recomienda utilizar el método del Número Más Probable (NMP) descrito por Ratto (1982), hasta la etapa de identificación (Anexo 9). Para la confirmación de *E. coli* O157:H7 se debe hacer uso de antisueros específicos. En el caso de tener un aislamiento e identificación de *E. coli* se acudiría a un laboratorio externo para realizar serología

Los medio de cultivo utilizados en este método son:

- Caldo Verde Brillante
- Agar Eosina Azul de Metileno

3.4.4 Investigación y aislamiento de *Salmonella* spp. en muestras positivas por prueba rápida del sistema Reveal®

Según la metodología descrita por Ratto (1982), se recomienda confirmar la presencia de *Salmonella* spp. por medio de los métodos convencionales aislando la bacteria en cultivos selectivos, identificándolo a través de pruebas bioquímicas, y confirmando el serotipo con antisueros específicos (Anexo 10).

Los medios de cultivo utilizados en este método son:

- Caldo lactosado (pre-enriquecimiento no selectivo)
- Caldo Tetrionato (selectivo)
- Caldo Selenito Cistina (selectivo)
- Agar Verde Brillante
- Agar *Salmonella-Shigella*

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PLANTA DE LÁCTEOS

4.1.1 Métodos rápidos de ELISA para detección de patógenos

Se realizaron un total de 54 análisis de pruebas rápidas a productos lácteos, repartidas en 18 pruebas para cada patógeno específico, *E coli* O157:H7, *Listeria spp.* y *Salmonella spp.* Cada uno de los seis productos fue investigado por la presencia de cada patógeno en las tres muestras analizadas. Los análisis dieron 100% resultados negativos en cuanto a la presencia de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella spp.* en todos los productos evaluados (Cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados de las pruebas de ELISA en productos lácteos.

Producto	Lote	<i>E. Coli</i> O157:H7	<i>Listeria spp.</i>	<i>Salmonella spp.</i>
L. semi descremada	121101	-	-	-
L. chocolate	121101	-	-	-
Helado	141101	-	-	-
C. Ácida	141101	-	-	-
Q. Crema	171101	-	-	-
Q. Cabaña	171101	-	-	-
L. semi descremada	201101	-	-	-
L. chocolate	201101	-	-	-
Helado	211101	-	-	-
C. Ácida	211101	-	+	-
Q. Crema	211101	-	-	-
Q. Cabaña	211101	-	-	-
L. semi descremada	290102	-	-	-
L. chocolate	290102	-	-	-
Helado	300102	-	-	-
C. Ácida	290102	-	-	-
Q. Crema	290102	-	-	-
Q. Cabaña	300102	-	-	-
No. total de análisis		18	18	18
No. de muestras positivas		0	1	0
Porcentaje de positividad (%)		0	5.55	0

Lote. Fecha en que se realizó el análisis de la muestra

Por otro lado, en la detección de *Listeria*, una de las muestras de crema ácida correspondiente a la segunda semana de análisis (lote 211101) dio positivo, lo cual indicó que existía la presencia de alguna especie de este género en el producto (Anexo 11). Sin embargo, por razones explicadas en la sección de materiales y métodos, este resultado no pudo ser confirmado por medio de las pruebas bioquímicas, por tanto no se pudo conocer el tipo de *Listeria* presente en este producto. Este resultado positivo representa el 5.55% del total de pruebas para *Listeria*.

Se ha reportado que *Listeria* es capaz de crecer en un pH de 4.1 a 9.6 y a temperaturas mínimas de 0.5 a 3°C, por lo tanto su presencia dentro de un producto como la crema ácida puede deberse a esta característica de la bacteria.

Según la corporación Neogen, un resultado positivo con el sistema Reveal® puede obtenerse de cualquier especie de *Listeria* y no necesariamente de *L. monocytogenes*, que es la única especie patogénica al humano. Sin embargo, un resultado positivo con este método es indicativo que la sanidad o las prácticas de manufactura deben modificarse para reducir al máximo la probabilidad de que *L. monocytogenes* esté presente en el alimento.

4.1.2 Cómputos estándares en placa para el conteo microbiológico.

4.1.2.1 Leche semi descremada. Los resultados obtenidos tanto para mesófilos aerobios como para coliformes totales, demostraron que la leche semi descremada de la planta cumple con las normas establecidas y que por tanto su calidad microbiológica es muy buena y no representa un riesgo para la salud pública (Cuadro 2).

Para el cómputo de coliformes totales todos los resultados obtenidos mostraron una cantidad menor a 10 UFC/ml, lo cual confirma que el control establecido para el procesamiento de este producto es eficiente. Esto también puede ser favorecido por el diferente procesamiento que lleva la leche semi descremada ya que en su elaboración, la exposición al ambiente es menor que en la elaboración de otros productos.

Cuadro 2. Cómputos estándares en placa para leche semi descremada.

Semanas	Lote	Mesófilos aerobios totales (UFC/ml)	Coliformes totales (UFC/ml)
		VR: 50×10^3	VR: 30
1	121101	60×10	<10 e
2	201101	53×10	<10 e
3	290102	27×10^2	<10 e

VR. Valor de referencia según División de Control de Alimentos del Ministerio de Salud Pública de Honduras.

e. Valor estimado.

4.1.2.2 Leche chocolate. El cómputo de coliformes totales para la leche chocolate dió resultados menores a 10 UFC/ml en todas las muestras analizadas, lo cual esta por debajo de la norma que permite hasta 30 UFC/ml (Cuadro 3).

En cuanto a los resultados obtenidos del cómputo de mesófilos aerobios se encontró que la muestra perteneciente a la tercera semana de análisis (lote 290102) tenía una carga microbiana levemente superior a lo permitido. La explicación para esta elevada carga no se puede definir en base a estos resultados ya que los factores que influyen en la calidad microbiológica de un alimento son muchos y están distribuidos a lo largo de la cadena de producción. Por lo tanto, al tener un resultado final en el producto microbiano solo nos permite saber si el producto cumple o no, con las normas. Sin embargo se sugiere considerar la calidad de ingredientes como la cocoa en polvo, además de los PEOS y BPM.

Cuadro 3. Cómputos estándares en placa para leche chocolate.

Semanas	Lote	Mesófilos aerobios totales (UFC/ml)	Coliformes totales (UFC/ml)
		VR: 10×10^4	VR: 30
1	121101	21×10	<10 e
2	201101	31×10^3	<10 e
3	290102	24×10^4	<10 e

4.1.2.3 Helado. Los análisis de este producto tuvieron mayor variación que los anteriores tanto para el cómputo de mesófilos aerobios como para coliformes totales.

La muestra perteneciente a la primera semana (lote 141101) cumplió con todas las normas establecidas, mientras que la muestra de la tercera semana (lote 300102) tuvo una carga superior a la norma tanto en mesófilos aerobios como en coliformes totales lo cual demuestra que el producto elaborado dentro de ese lote no cumplió con la calidad microbiológica establecida por la división de control de alimentos. Por otro lado la muestra de la segunda semana (lote 211101) tuvo una cantidad elevada de mesófilos aerobios, pero una cantidad por debajo de lo permitido de coliformes totales (Cuadro 4). Estas dos muestras reflejan que hay puntos de control en el proceso que no se manejaron correctamente.

Cuadro 4. Cómputos estándares en placa para helado.

Semanas	Lote	Mesófilos aerobios totales (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)
		VR: 50×10^3	VR: 100
1	141101	18×10	<10 e
2	211101	12×10^4	<10 e
3	300102	13×10^4	53×10

4.1.2.4 Crema ácida. Para este producto se realizaron cálculos de coliformes totales y hongos. La muestra perteneciente a la segunda semana (lote 211101) tuvo un nivel superior a la norma tanto para coliformes totales como para hongos y fue la misma muestra en la cual se obtuvo un resultado positivo para *Listeria* spp. No se puede descartar que mientras más elevado es el número de microorganismos indicadores, mayor es el riesgo potencial de que un microorganismo patógeno esté presente en el alimento.

Las muestras de las semanas uno y tres también tuvieron un elevado número de hongos, especialmente la muestra de la semana tres (lote 290102) que reportó 3400 UFC/g, siendo lo permitido 100 UFC/g. (Cuadro 5). Se debe tener en consideración que el pH bajo del producto favorece el crecimiento de mohos y levaduras.

Cuadro 5. Cálculos estándares en placa para crema ácida.

Semanas	Lote	Coliformes totales (UFC/g)	Mohos y levaduras (UFC/g)
		VR: 100	VR: 100
1	141101	<10 e	26x10
2	211101	57x10	88x10
3	290102	<10 e	34x10 ²

4.1.2.5 Queso crema. La cantidad de coliformes totales en este producto fue superior a lo permitido en todas las muestras analizadas ya que su valor excedió de 30 UFC/g. Por el contrario, el cálculo de hongos, cuyo límite es 100 UFC/g, estuvo dentro de lo permitido en todas las muestras evaluadas aunque la variabilidad en los resultados de cada muestra, fue muy notoria (Cuadro 6).

La carga microbiana elevada en el cálculo de coliformes totales puede ser producto de un proceso inadecuado, el cual es afectado por el personal, por la inexperiencia de los estudiantes que participaron en la elaboración de este producto, o por el mal funcionamiento o limpieza de algún equipo dentro del proceso.

Cuadro 6. Cálculos estándares en placa para queso crema.

Semanas	Lote	Coliformes totales (UFC/g)	Mohos y levaduras (UFC/g)
		VR: 30	VR: 100
1	171101	20x10	60
2	211101	24x10	<10 e
3	290102	55x10	20

4.1.2.6. Queso cabaña. Los resultados obtenidos para este queso estuvieron dentro de lo permitido tanto para el conteo de hongos como para el de microorganismos psicrófilos excepto por la muestra de la tercera semana (lote 300102), que tuvo una carga elevada de psicrófilos de 440 UFC/g siendo el máximo permitido 100 UFC/g (Cuadro 7).

Cuadro 7. Cómputos estándares en placa de queso cabaña.

Semanas	Lote	Mohos y levaduras (UFC/g)	Psicrófilos (UFC/g)
		VR: 10	VR: 100
1	171101	<10 e	<10 e
2	211101	<10 e	<10 e
3	300102	<10 e	44x10

En general la mitad de las muestras tomadas en la planta de lácteos cumplieron con todas las normas microbiológicas establecidas; las tres muestras de leche pertenecen a este grupo. Mientras que todas las muestras de crema ácida y queso crema tuvieron problemas con alguno de sus cómputos o ambos.

El número elevado de mesófilos aerobios, psicrófilos y hongos están relacionados con contaminación ambiental, mientras que los cómputos de coliformes se asocian más al manipuleo o manejo del alimento en el proceso de elaboración. Productos como el helado y la crema ácida tienen un cómputo elevado de mesófilos aerobios y hongos respectivamente por lo que se puede presumir de una contaminación ambiental posterior al tratamiento térmico. Esta carga microbiana elevada en el helado puede deberse a la incorporación del aire durante el batido y en la crema ácida a la exposición del producto al ambiente durante el tiempo que alcanza el pH requerido.

Según los análisis realizados por Romero (2000), el ambiente de la planta de lácteos, tanto en el laboratorio como en la sala de procesamiento, es inadecuado (Anexo 12). Esto aumenta el riesgo potencial de contaminación de los productos especialmente de aquellos que son expuestos al ambiente como en el caso de la elaboración de crema ácida y quesos.

El queso crema en cambio mostró una carga elevada de coliformes totales, por tanto se puede presumir de un mal manejo del producto al momento de su elaboración ya sea porque el tratamiento térmico no eliminó los microorganismos o porque éstos ingresaron al alimento en una etapa posterior debido al manipuleo inadecuado de operadores o estudiantes.

La concientización de los estudiantes en cuanto a la higiene y buenas prácticas de manufactura, tiene un efecto importante dentro de la calidad del producto. Debido a que la participación de los estudiantes en estos procesos es sumamente necesaria para la formación de los mismos, se debe programar talleres de capacitación que incentiven al estudiante a poner en práctica los BPM y PEO.

4.2 PLANTA DE CÁRNICOS

4.2.1 Métodos rápidos de ELISA para detección de patógenos

4.2.1.1 Detección de *E. coli* O157:H7. Las muestra de mortadela correspondiente a la primera semana de análisis (fecha 13/02/02) (Cuadro 8) fue la única en la cual se obtuvo un resultado débil positivo con la prueba de ELISA reportándose como un falso positivo ya que la banda formada por la muestra en el dispositivo fue casi imperceptible en la zona de detección (zona t) pero fue muy notoria en la zona de control por tanto se descarta el hecho de que el dispositivo haya estado en mala condiciones.

4.2.1.2 Detección de *Listeria* spp. Se obtuvieron resultados positivos para *Listeria* en la mayoría de los productos. El jamón de cerdo fue el único producto que dio resultados negativos en las tres muestras analizadas (Cuadro 8).

Las muestras de mortadela y salami imperial analizadas el 13 y 14 de febrero respectivamente, al igual que las muestras de jamón virginia y hot-dog analizadas el 26 de febrero resultaron positivas. Del mismo modo, las tres muestras de Chorizo español dieron resultados positivos para la detección de este microorganismo con las pruebas de ELISA del sistema Reveal[®] (Anexo 13). En resumen, estas pruebas positivas representan un 39% del total de pruebas realizadas para la detección de *Listeria*.

Según Jay (2000), en un estudio realizado en Estados Unidos por un periodo de 39 meses se logró detectar *L. monocytogenes* en un 7.1% de 1,727 muestras de res cruda. También se determino que un 2,8% de las carnes listas para consumir de 4,105 planta procesadoras resultaron positivas para el microorganismo.

Esta considerable cantidad de pruebas positivas, independientemente de la especie de *Listeria* a la que pertenezcan, deja entrever que la planta de Cárnicos de Zamorano tiene problemas de contaminación.

El vehículo de ingreso de este microorganismo a la planta de procesamiento puede cambiar en el tiempo debido a diferentes factores, entre ellos la estación del año, los cambios en las corrientes de aire y la calidad del agua. Por lo general las áreas más susceptibles a la contaminación con *Listeria* son los pisos, paredes, cielos rasos, canales, trampas de basura, cubetas, pozos de agua especialmente en el área de refrigeración, áreas donde la materia prima y el producto terminado se cruzan, mangueras, cuchillos, y todas las superficies que están en contacto con el alimento.

4.2.1.3 Detección de *Salmonella*. El jamón Virginia analizado el 12 de febrero del 2002 fue la única muestra que dio un resultado positivo para este microorganismo.

Cuadro 8. Resultados de las pruebas de ELISA en productos cárnicos.

Producto	Fecha	<i>E. Coli</i> O157:H7	<i>Listeria</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.
Jamón Virginia	12022002	-	-	+*
Jamon Cerdo	14022002	-	-	-
Mortadela	13022002	falso + *	+	-
Salami Imperial	14022002	-	+	-
Chorizo Español	14022002	-	+	-
Hot - Dog	14022002	-	-	-
Jamón Virginia	26022002	-	+	-
Jamon Cerdo	26022002	-	-	-
Mortadela	26022002	-	-	-
Salami Imperial	26022002	-	-	-
Chorizo Español	26022002	-	+	-
Hot - Dog	26022002	-	+	-
Jamón Virginia	13032002	-	-	-
Jamon Cerdo	13032002	-	-	-
Mortadela	13032002	-	-	-
Salami Imperial	13032002	-	-	-
Chorizo Español	13032002	-	+	-
Hot - Dog	13032002	-	-	-
No. total de análisis		18	18	18
No. de muestras positivas		0	7	1
Porcentaje de positividad (%)		0	39	5.55

* Salieron negativas en las pruebas bioquímicas de confirmación API E20

4.2.2 Cómputos estándares en placa para el conteo microbiológico

Los límites permitidos para mesófilos aerobios en productos cárnicos no han sido fijados por el Ministerio de Salud Pública de Honduras. En cambio, las normas para el número de coliformes totales si esta establecido y debe ser menor a 100 UFC/g en cualquiera de estos productos.

Sin embargo, se realizó el conteo de mesófilos aerobios para poder analizar mejor la condición microbiológica de estos productos y poder apreciar que tan variable es la calidad del mismo en cuanto a inocuidad.

4.2.2.1 Jamón Virginia. La muestra de jamón virginia correspondiente al 12 de febrero del 2002 fue la única muestra que tuvo un número elevado de coliformes totales (Cuadro 9) y fue la misma muestra que resultó positiva para la detección de *Salmonella*. Esto demuestra que a medida que el número de microorganismos aumenta en el alimento el riesgo de contaminación con microorganismos patógenos es también mayor.

En cuanto a la cantidad de mesófilos aerobios, esta muestra tuvo el conteo más alto comparado con las otras dos muestras analizadas, lo cual indica nuevamente que la calidad microbiológica del lote al que pertenece esta muestra no fue satisfactoria.

Cuadro 9. Cómputos estándares en placa de jamón virginia.

Semanas	Lote	Mesófilos aerobios totales (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)
		VR: ---	VR: 100
1	120202	48×10^6 e	11×10
2	260202	31×10^5	10
3	130302	15×10^4	10

4.2.2.2 Jamón de cerdo. La muestra correspondiente al 14 de febrero del 2002 (primera semana de análisis) mostró un nivel elevado de coliformes totales, mientras que las demás muestras tuvieron un conteo inferior a 10 UFC/g. En cuanto a la cantidad de mesófilos aerobios este producto resultó con el conteo más alto en la segunda semana y su conteo más bajo se encontró en la tercera semana. Este producto fue el único que dio resultados negativos en todas las pruebas de detección de patógenos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Cómputos estándares en placa de jamón de cerdo.

Semanas	Lote	Mesófilos aerobios totales (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)
		VR: ---	VR: 100
1	140202	49×10^4	38×10
2	260202	89×10^4	<10 e
3	130302	12×10^4	<10 e

4.2.2.3 Salami imperial. En la primera semana el conteo de coliformes fue superior a lo permitido. De la misma manera esta muestra fue la que tuvo el mayor número de mesófilos aerobios y fue la que dio positiva para la detección de *Listeria* en las pruebas de ELISA, lo cual indica que este producto no tenía la calidad microbiológica adecuada (Cuadro 11).

En cuanto a las dos muestras restantes, el número de coliformes totales estuvo dentro de lo permitido notándose un descenso en la tercera semana. De la misma forma el número de mesófilos aerobios también fue disminuyendo de la primera a la tercera muestra en forma progresiva.

Cuadro 11. Cómputos estándares en placa de salami imperial.

Semanas	Lote	Mesófilos aerobios totales (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)
		VR: ---	VR: 100
1	140202	40×10^6 e	58×10
2	260202	13×10^4	40
3	130302	81×10^3	<10 e

4.2.2.4 Mortadela. Las muestras correspondientes a la primera y segunda semana (13 y 26 de febrero, respectivamente) mostraron cantidades superiores a las permitidas en coliformes totales. Del mismo modo el nivel de mesófilos aerobios fue mayor en la primera semana y su número fue reduciéndose progresivamente en las siguientes semanas (Cuadro 12).

La muestra de la primera semana además de ser la de mayor carga microbiana, dio un resultado positivo para *Listeria* (sin tomar en cuenta el resultado reportado como falso negativo para *E. coli* O157:H7 por las razones anteriormente expuestas). A pesar de que la prueba no se llegó a confirmar, dicho resultado es indicativo de que la elaboración de este producto fue inadecuada y por tanto su flujo de proceso debe ser supervisado con mayor detenimiento.

Cuadro 12. Cómputos estándares en placa de mortadela.

Semanas	Lote	Mesófilos aerobios totales (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)
		VR: ---	VR: 100
1	130202	11×10^4	19×10
2	260202	96×10^3	20×10
3	130302	55×10^3	<10 e

4.2.2.5 Chorizo español. Las tres muestras de este producto tuvieron cantidades inferiores al límite establecido para coliformes totales, sin embargo todas dieron resultados positivos para la identificación de *Listeria*, por lo tanto existe el riesgo de la presencia de *L. Monocytogenes*, que es patógena al humano (cuadro 13). Esto indica, que a pesar de que se utiliza la determinación de microorganismos indicadores como los coliformes, los bajos niveles de éstos, no excluyen la presencia de patógenos específicos.

En cuanto a la cantidad de mesófilos aerobios, el número más alto se obtuvo en la primera muestra y la reducción fue progresiva al igual que en los otros productos.

Cuadro 13. Cómputos estándares en placa de chorizo español.

Semanas	Lote	Mesófilos aerobios totales (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)
		VR: ---	VR: 100
1	140202	57×10^5	10
2	260202	21×10^4	<10 e
3	130302	73×10^3	10

4.2.2.6 Hot-dog. La muestra de la primera semana (14 de febrero) fue la única en la que se obtuvo un resultado ligeramente superior al límite permitido de 100 UFC/g. Mientras que el conteo de mesófilos aerobios llevó el mismo patrón de los productos anteriores. La muestra de la segunda semana (26 de febrero) fue la que dio positiva para *Listeria* y no fue precisamente la que contuvo la carga microbiana más alta (Cuadro 14).

Cuadro 14. Cómputos estándares en placa de hot-dog.

Semanas	Lote	Mesófilos aerobios totales (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)
		VR: ---	VR: 100
1	140202	21×10^5	11×10
2	260202	26×10^3	<10 e
3	130302	79×10^2	<10 e

En términos generales, solo la mitad de las muestras evaluadas cumplió con todas las normas microbiológicas. El resto de muestras tuvieron problemas ya sea con el cómputo de placas o con la detección de microorganismos patógenos.

Para tener un parámetro de comparación, se complementó la norma del Ministerio de Salud con los límites utilizados en España para productos cárnicos de similar elaboración. Estos cómputos muestran una proporción similar de cargas elevadas de mesófilos aerobios y coliformes totales, reflejando también, la contaminación ambiental y el inadecuado proceso que puede existir en la planta.

El ambiente de la sala de procesamiento y los equipos utilizados para la elaboración de estos productos también influyen sobre esta variabilidad en la carga microbiana. Uno de los equipos más propensos a contaminación es el molino ya que por éste pasa toda la materia prima cárnica. En el análisis realizado por el CEA al ambiente y equipos de la planta de cárnicos, se obtuvieron cargas microbianas elevadas en el molino y en la mesa de trabajo en lo que respecta a la sala de procesamiento. Del mismo modo, el ambiente de esta sala también tenía una carga ligeramente elevada de mesófilos aerobios.

La planta de cárnicos tiene mayor riesgo de contaminación ambiental en la sala de procesamiento debido al acceso libre entre el rastro, la sala de desposte y la sala de procesamiento. Además el paso continuo de bandejas desde el rastro hasta la sala de proceso son agentes de contaminación cruzada.

La ubicación de las plantas dentro de Zamorano pueden favorecer en gran medida a la contaminación ambiental de las mismas debido a la cercanía de éstas con el establo, potreros y a la calle de tierra. También la planta de concentrados ubicada al frente de la de lácteos es una de las que más puede contribuir a la contaminación ambiental debido a la cantidad de polvo que se levanta de ésta.

El diseño de ambas plantas no son los adecuados debido a los diferentes accesos que tienen las salas de procesamiento. Además, en la planta de cárnicos, la puerta que separa el salón de enseñanza con la sala de procesamiento no está cubierta de vidrio lo cual permite el libre acceso de esporas.

El almacenamiento de materia prima y producto terminado es también otro factor que influye en la calidad microbiológica. Por ejemplo, los recipientes de los condimentos utilizados en productos cárnicos no están bien limpios.

Se debe cuidar la contaminación cruzada dentro de las plantas y entre ellas, por tanto en la planta de lácteos se debería analizar las ventajas de adquirir un cutter para la elaboración de ciertos quesos que requieren de ese equipo y que en la actualidad tiene que recurrir al cutter de la planta de cárnicos. También el almacenamiento de envases de productos lácteos en la bodega continua al corral del rastro representa un riesgo de contaminación muy fuerte.

Por último, se debe considerar también que la presencia de estudiantes en las labores de ambas plantas puede favorecer la variabilidad de las cargas microbianas dentro de los productos. Esto puede deberse a la falta de experiencia del estudiante en la ejecución de los procesos que se llevan a cabo en las plantas o por el desconocimiento de ellos acerca de los BPM y SOP.

Junto con los cómputos microbianos también se realizaron controles de agua peptonada al 0.1% y controles de cada uno de los diferentes medios utilizados obteniéndose cero crecimiento de bacterias o de hongos.

4.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS QUE DIERON RESULTADOS POSITIVOS POR ELISA

4.3.1 Planta de lácteos

No se realizó aislamiento e identificación para *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* ya que no se obtuvieron positivos. En lo referente a *Listeria* positiva en la crema ácida no se pudo realizar estos análisis debido a que el laboratorio de alimentos del CEA no cuenta con los medios de cultivo selectivos y pruebas bioquímicas para identificación.

4.3.2 Planta de cárnicos

4.3.2.1 Aislamiento e identificación de *E. coli* O157:H7. Para confirmar este resultado obtenido en la mortadela se utilizó la técnica del “Número más probable” (Anexo 9), sin embargo no se pudo lograr el aislamiento del microorganismo ya que en el primer paso de esta técnica, con el medio Brilla (caldo verde brillante-bilis-lactosa) no hubo crecimiento de ningún tipo de microorganismo y por tanto no se pudo efectuar el aislamiento en medio EMB ni la identificación por medio de las pruebas bioquímicas API 20E.

La no-detección del patógeno por medio de la técnica del Número más probable puede ser explicada por dos razones:

- La cantidad de células del microorganismo era tan baja en el alimento, que no se encontró dentro del fragmento de muestra utilizada (11g) para el Número más probable, pero sí estuvo presente en la muestra utilizada para la prueba de ELISA. Esto se debe a que las células del patógeno no están completamente dispersas en el alimento ya que el crecimiento puede darse en un solo punto de la muestra. En alimentos sólidos por lo general el patógeno queda atrapado en lugares específicos de alimento (Anexo 14).
- El patógeno en realidad no estuvo presente en el alimento y la débil banda formada en el dispositivo se debió a que el dispositivo requería más tiempo del recomendado para llegar a temperatura ambiente antes de ser utilizado.

La Corporación Neogen asegura que la mayoría de los casos reportados como falsos positivos en detección de *E. coli* O157:H7 y en *Salmonella* con las pruebas Reveal[®], en realidad no son falsos positivos sino que las técnicas tradicionales son inadecuadas para aislar el patógeno de interés. Para resolver este problema la misma casa ha desarrollado una prueba confirmativa basada en esferas magnéticas las cuales son cubiertas con los anticuerpos del patógeno de interés. Estas esferas son mezcladas con una porción de la muestra enriquecida y todas las células de este microorganismo serán capturadas por esta partícula. Este método reduce notoriamente el número de supuestos falsos positivos.

Hasta la fecha en Honduras no se ha reportado el aislamiento de *E. coli* O157:H7 en ningún alimento, por lo que se reportaría el resultado como falso positivo o negativo. Es importante recalcar que siempre se debe continuar con el monitoreo de este microorganismo para descartar su presencia en los productos.

4.3.2.2 Aislamiento e identificación de *Listeria* spp. La posibilidad de identificar la especie de *Listeria* en un laboratorio externo se exploró con la gerencia de la zamoempresa de lácteos y cárnicos al obtener 7 positivos de los 18 análisis realizados para este organismo. El costo del análisis fue de L.400 por muestra.

Solamente la última muestra analizada de chorizo español que dio positivo en las pruebas de ELISA se envió a un laboratorio externo (Laboratorio Agrobiotek) para ser aislada e identificada. Este laboratorio reportó el aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes*.

4.3.2.3 Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. Se utilizó el método clásico para aislar *Salmonella* siguiendo los tres pasos básicos de enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo y siembra en placas de medios selectivos.

En las placas sembradas se encontraron dos colonias presuntivas de ser *Salmonella*, sin embargo, al realizar las pruebas bioquímicas API 20E los microorganismos aislados e identificados fueron *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae*. Esta última bacteria ya fue anteriormente aislada en un experimento realizado por Vaca (2001) al desarrollar un nuevo producto el cual consistía en una salchicha elaborada a partir de carne de pavo mecánicamente deshuesada.

Debido a la complejidad de las pruebas API, los resultados obtenidos están complementados con un rango de eficiencia de la prueba que va desde una identificación regular hasta una excelente identificación. En el caso de los microorganismos aislados, las pruebas resultaron ser excelentes identificaciones en ambos casos (Anexo 15).

5. CONCLUSIONES

No se obtuvieron resultados positivos para *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. en ninguno de los productos lácteos y cárnicos evaluados en el estudio.

Solamente una muestra de crema ácida resultó positiva para *Listeria* spp. Ésta representa el 6% del total de muestras analizadas en esta Planta.

En la planta de cárnicos se obtuvieron siete muestras positivas para *Listeria* spp. Tres fueron de chorizo español; las cuatro restantes fueron de mortadela, salami imperial, jamón virginia y hot-dog. Estas muestras representan el 39% del total de pruebas para *Listeria* realizadas a los productos cárnicos

Se confirmó la presencia de *Listeria monocytogenes* en una muestra de chorizo español analizada por un laboratorio privado.

Según los cálculos estándares realizados en la planta de lácteos, se encontró que la leche semi descremada y la leche chocolate cumplen con las normas microbiológicas establecidas. Por el contrario, hay otros productos como la crema ácida y el queso crema que no cumplen con las normas.

En los productos cárnicos, por b menos una de las tres muestras de cada producto, no cumplió con las normas microbiológicas establecidas, reflejando la falta de un control microbiológico efectivo en los procesos de elaboración.

El reducido número de pruebas de ELISA, y las limitantes del estudio, no permitieron definir con exactitud cual es el factor o los factores que influyen en mayor porcentaje sobre la calidad microbiológica de estos productos. Sin embargo, se pudo comprobar que falta mejorar los procedimientos para el uso correcto de BPM y SOP al igual que el control microbiológico eficaz.

6. RECOMENDACIONES

Se debe capacitar continuamente al personal (empleados y estudiantes) en la aplicación de los BPM y PEOS para que tomen conciencia de la importancia de estos procedimientos y que comprendan la gran responsabilidad que tienen al ser parte de este proceso productivo.

Para tener un control más exhaustivo y permanente se puede hacer uso de métodos rápidos que puedan detectar en cuestión de minutos si un equipo está limpio o no. A la par del análisis de los equipos se debe analizar continuamente el ambiente de la sala de producción, de las bodegas y cuartos de almacenamiento del producto terminado.

Para todos estos análisis es muy importante diseñar un plan de muestreo que permita obtener resultados significativos y de los cuales se pueda hacer inferencia estadística de tal manera que sean un respaldo al momento de tomar una decisión determinada o hacer inspecciones. Esto implica también llevar un registro ordenado de los mismos.

Es indispensable equipar un laboratorio microbiológico donde se pueda llevar a cabo un programa de control de calidad continuo tanto de los productos terminados como de las operaciones que se realizan en las plantas. Zamorano cuenta con un laboratorio microbiológico de alimentos, sin embargo este tiene muchas limitaciones siendo la principal, la falta de medios de cultivo selectivos y la falta de un técnico de laboratorio que trabaje permanentemente en estos análisis.

Se recomienda la incorporación de un etiqueta adhesiva al empaque en la cual se indique el manejo adecuado del producto por parte del consumidor (Anexo16).

Debido a las limitaciones de este estudio, principalmente en lo referente a la reducida disponibilidad de las pruebas de ELISA y a la falta de medios selectivos para realizar los análisis confirmatorios, se recomienda realizar un estudio complementario enfocado al análisis del ambiente de las plantas al igual que de los equipos. Del mismo modo se debería realizar un estudio microbiológico segmentado en cada una de las etapas del procesamiento empezando por determinar la calidad de la materia prima, hasta finalizar el proceso. De esta manera se podrá detectar cual es el factor que está afectando la calidad del producto final.

Para asegurarse que el producto llegue en las condiciones deseadas a las manos del consumidor, también se recomienda realizar un estudio adicional dedicado a evaluar toda la cadena de comercialización analizando el manipuleo del producto desde que sale de la planta hasta que es adquirido por el consumidor en los diferentes puntos de venta.

Se recomienda que como política institucional se apoyen y realicen todos los esfuerzos necesarios para garantizar la calidad y especialmente la inocuidad de los productos elaborados en las plantas de Zamorano.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Buchanan, R.; Doyle, M. 1997. Foodborne disease significance of Escherichia coli O157:H7 and other enter hemorrhagic E. coli. *Food Technology (Estados Unidos)* 51(10):69-76.
- Corlett, J. 1998. HACCP User's Manual. Maryland, US. Aspen Publishers Inc. 515 p.
- Fung, D. Y. 1995. What's hended in rapid detection of foodborne pathogens. *Food Technology (Estados Unidos)* 49(6):64-67.
- Food Safety an Inspection Service (FSIS). 2002. An overview of the HACCP: Based inspections models project (en línea). Washington D.C. US. Consultado 3 abril 2002. Disponible en: http://www.fsis.usda.gov/OA/background/himp_overview.htm
- Giese, J. 1995. Rapid microbiological testing kits and instruments. *Food Technology (Estados Unidos)* 49(7):64-70.
- Gunther, H.O. 1990. Immunochemical Methods. *In* Rapid methods for analysis of food and food raw material. Ed. W. Baltes. Technomic Publishing Company. p. 321-329.
- INPPAZ OPS/OMS. 2001. Situación de brotes de ETA en las Américas (en línea). Consultado 20 ene. 2002. Disponible en: <http://www.inppaz.org.ar/>
- Jay, J. M. 2000. Modern Food Microbiology. 6ed. Maryland, US. Aspen Publishers Inc. 679 p.
- Kaferstein, F. K.; Motarjemi, Y.; Moy, G.; Quevado, F. 1999. Food Safety: a worldwide public issue. *In* International food Safety Handbook. Ed K. Heijden. New York, Marcel Dekker Inc. p. 1-21.
- Marth. E.H. 1986. Enfermedades de origen microbiano transmitidas por los alimentos. *In* Sanidad alimentaria. Ed.H.R. Roberts. Zaragoza, ES. Editorial Acribia. p. 12-52.
- Miller, J.J. 1998. Food Safety. Minnesota.US. Eagan press. 433 p.
- Notermans, S. H.; Mead, G. 1999. Assessment of Microbiological Food Safety. *In* International food Safety Handbook. Ed K. Heijden. New York, Marcel Dekker Inc. p. 409-435.

Pearson, A.; Dutson, T. 1996. HACCP in Meat. Poultry and Fish Processing. Great Britain. Blackie A. & P. 393 p.

Porta, R.G. 1999. Problemática actual de la Salmonella enteritidis (en línea). Cataluña. ES. Consultado 29 sep. 2001. Disponible en: <http://www.ucm.es/info/mfar/salmonella.html>.

Ratto, M. A. 1982. Examen microbiológico de carnes y productos cárnicos. Lima, Perú. Universidad Nacional Superior de San Marcos. 35 p.

Romero Pavón, R. A. 2000. Establecimiento de un sistema de análisis de riesgo y puntos críticos de control para helado y yogur en Zamorano. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras. 92 p.

Vanderzant, C.; Splittstoesser D. F. 1992. Compendium of methods for the Microbiological Examination of foods. 3 ed. Washington D.C. American Public Health Association Inc. (APHA). 1219 p.

Anexo 1. Bacterias asociadas con enfermedades transmitidas por alimentos.

Cuadro 15. Características de bacterias importantes causantes de ETA

Bacteria	Reservorios importantes	Transmisión ^a por:			Multiplicación en alimentos	Alimentos asociados
		agua	alimento	persona a persona		
<i>Bacillus cereus</i>	suelo	-	+	-	+	arroz cocido, carne cocida, vegetales, pudines
<i>Brucella spp.</i>	ganado, ovejas, cabras	-	+	-	+	leche y productos lácteos
<i>Campylobacter jejuni</i>	aves, perros, gatos, ganado, cerdos, aves silvestres	+	+	+	- ^b	leche, pollo
<i>Clostridium botulinum</i>	suelo, mamíferos, aves, peces	-	+	-	+	pescado, carne, vegetales
<i>Clostridium perfringens</i>	suelo, animales, humanos	-	+	-	+	pollo y carnes cocidas, frijoles
<i>E. coli enterotoxigénica</i>	humanos	+	+	+	+	ensaladas, vegetales
<i>E. coli enteropatógena</i>	humanos	+	+	+	+	leche
<i>E. coli enteroinvasiva</i>	humanos	+	+		+	quesos
<i>E. coli enterohemorrágica</i>	ganado, aves, cabras	+	+	+	+	productos cárnicos, productos lácteos
<i>Listeria monocytógenes</i>	ambiente	+	+	- ^c	+	quesos, leche, productos cárnicos
<i>Mycobacterium bovis</i>	ganado	-	+	-	-	leche
<i>Salmonella typhi</i> y <i>paratyphi</i>	humanos	+	+	±	+	productos lácteos, productos cárnicos, mariscos, vegetales
<i>Salmonella</i> (otras especies)	humanos, animales	±	+	±	+	carne, pollo, huevos, productos lácteos, chocolate
<i>Siguelia spp.</i>	humanos	+	+	+	+	papas, huevos, ensaladas
<i>Staphylococcus aureus</i>		-	+	-	+	jamon, pollo, ensaladas, productos de panadería, helados, quesos
<i>Vibrio cholerae</i>	humanos, vida marina	+	+	±	+	ensaladas, mariscos
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	vida marina	-	+	-	+	pescado, cangrejo, mariscos
<i>Vibrio vulnificus</i>	vida marina	+	+	-	+	mariscos
<i>Yersinia enterocolitica</i>	agua, animales silvestres, cerdos, perros, aves	+	+	-	+	leche, cerdo, pollo

^a La mayoría de infecciones entéricas agudas muestran un incremento de transmisión durante el verano y/o meses húmedos, excepto infecciones de *Yersinia enterocolitica* la cual muestra un incremento en los meses más fríos.

^b Se ha observado multiplicación bajo ciertas circunstancias.

^c La transmisión vertical de embarazada a su feto ocurre frecuentemente.

+ = sí

- = no

± = raro

Fuente: Kaferstein *et al* (1999)

Anexo 2. Datos reportados por la Organización Panamericana de la Salud.

Cuadro 16. Alimentos involucrados en brotes epidemiológicos.

Alimento	brotes	%	enfermos	%	fallecidos	%
agua	296	18.59	11375	19.95	7	11.29
carnes rojas	257	16.14	16915	29.67	2	3.23
pescados	185	11.62	2114	3.71	2	3.23
lácteos	143	8.98	3099	5.44	24	38.71
huevo-mayonesa	137	8.61	3321	5.82	1	1.61
carne de aves	98	6.16	4708	8.26	0	0
hortalizas	39	2.45	1507	2.64	3	4.84
bebidas	19	1.19	550	0.96	4	6.45
frutas	11	0.69	143	0.25	1	1.61

Cuadro 17. Agentes etiológicos causantes de los brotes.

Agente etiológico	brotes	%	enfermos	%	fallecidos	%
<i>Salmonella sp</i>	302	22.72	12662	25.59	9	15
Hepatitis A	202	15.2	3899	7.88	2	3.33
<i>Staphylococcus aureus</i>	188	14.15	7454	15.06	1	1.67
<i>Escherichia coli</i>	79	5.94	4652	9.4	0	0
<i>Salmonella enteritidis</i>	38	2.86	1942	3.92	0	0
<i>Salmonella typhi</i>	14	1.05	461	0.93	1	1.67
<i>Clostridium botulinum</i>	2	0.15	12	0.02	1	1.67

Cuadro 18. Locales de ocurrencia involucrados en los brotes.

Local	brotes	%	enfermos	%	fallecidos	%
vivienda	646	36.77	6092	10.32	16	41.03
otros	376	21.4	18611	31.52	14	35.9
escuela	298	16.96	15242	25.82	0	0
comedor	268	15.25	13601	23.04	5	12.82
restaurante	115	6.55	3211	5.44	3	7.69
unidad de salud	37	2.11	1703	2.88	1	2.56
pto. Callejero	17	0.97	578	0.98	0	0

Cuadro 19. Brotes según el tipo de agente.

Agente etiológico	%
bacterias	66.44
virus	15.8
toxinas marinas	9.63
químico	3.61
toxina vegetal	2.48
parásito	2.03

Datos reportados desde el año 98 al 2001

Anexo 3. Pruebas de ELISA utilizadas para la detección de patógenos.



Pruebas para la detección de *E. coli* O157:H7.



Pruebas para la detección de *Listeria* spp.



Pruebas para la detección de *Salmonella* spp.

Anexo 4. Procedimiento de ELISA para detección de *E. coli* O157:H7.

Preparación y enriquecimiento de la muestra:

1. Hidratar un el medio “Reveal[®] 20” con 225 ml de agua destilada estéril a 36°C en una bolsa stomacher. Agregar 25 g (o 25 ml) de muestra y homogenizar en el Stomacher por dos minutos.
2. Incubar la bolsa a 36°C por 20 hr. Asegurarse de que la bolsa no este fuertemente cerrada ya que el intercambio de aire es necesario para el crecimiento del microorganismo.

Uso del dispositivo Reveal:

1. Sacar el dispositivo del refrigerador para que se mantenga a temperatura ambiente e identificarlo correctamente antes de usarlo.
2. Con el gotero plástico transferir 5 gotas del tubo de ensayo al puerto del dispositivo y observar los resultados durante 15 min. Observaciones después de este tiempo pueden dar resultados incorrectos.

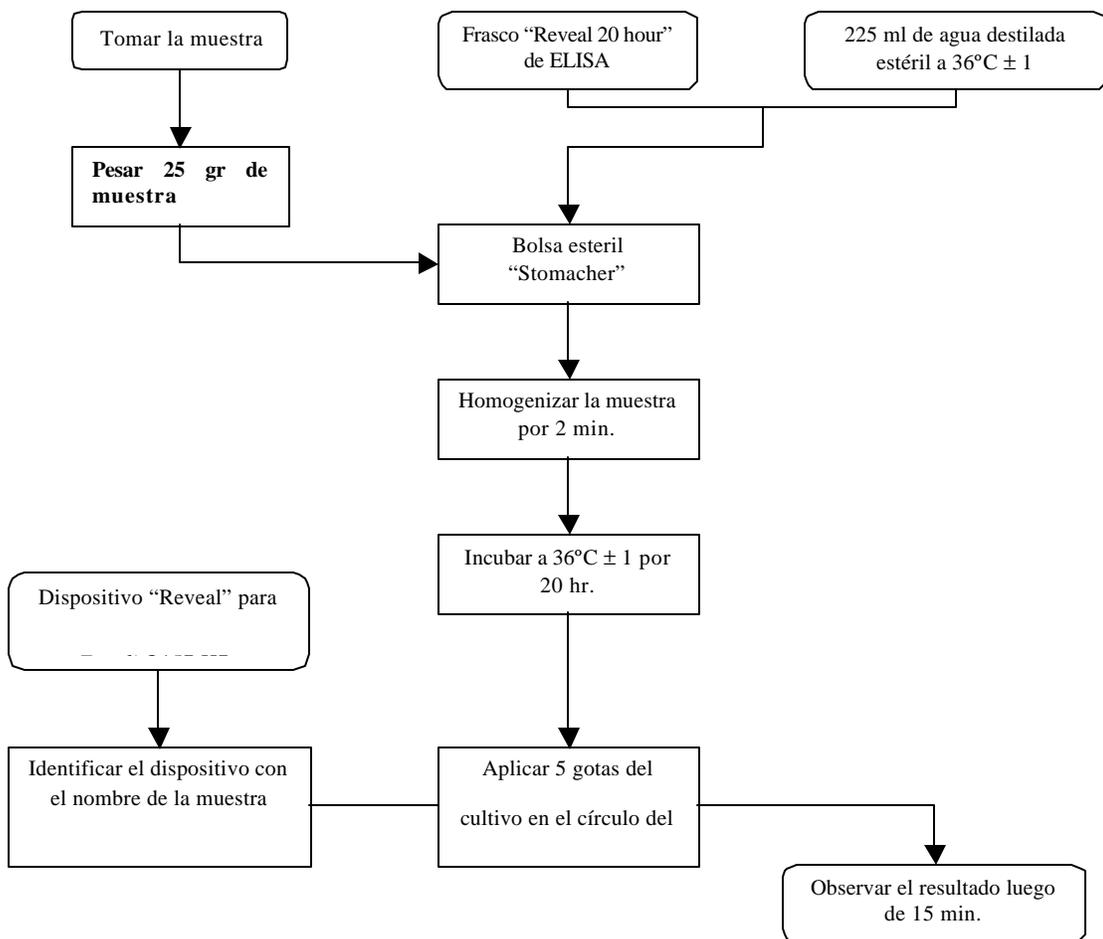


Figura 1. Flujograma de ELISA para la detección de *E. coli* O157:H7

Anexo 5. Procedimiento de ELISA para detección de *Listeria*.

Preparación y enriquecimiento de la muestra:

1. Hidratar un frasco de “Half Fraser Broth” con 225 ml de agua destilada estéril a temperatura ambiente en una bolsa stomacher. Agregar 25 g (o 25 ml) de muestra y homogeneizar en el Stomacher por dos minutos. Incubar la bolsa a 30°C por 21 hr.
2. Hidratar un frasco de “BLEB” adicionando 10 ml de agua destilada estéril. Retirar la bolsa stomacher de la incubadora y transferir 0.1 ml al frasco hidratado de “BLEB”. Incubar este frasco a 30°C por 21 hr.
3. Retirar el frasco de la incubadora sin mover y transferir dos mililitros de la región superior del cultivo a un pequeño tubo de ensayo. Colocar el tubo en baño maría a 80°C por 20 min. Enfriar a temperatura ambiente.

Uso del dispositivo Reveal:

1. Sacar el dispositivo del refrigerador para que se mantenga a temperatura ambiente e identificarlo correctamente antes de usarlo.
2. Con el gotero plástico transferir 6 gotas del tubo de ensayo al puerto del dispositivo y observar los resultados durante 20 min. Observaciones después de este tiempo pueden dar resultados incorrectos.

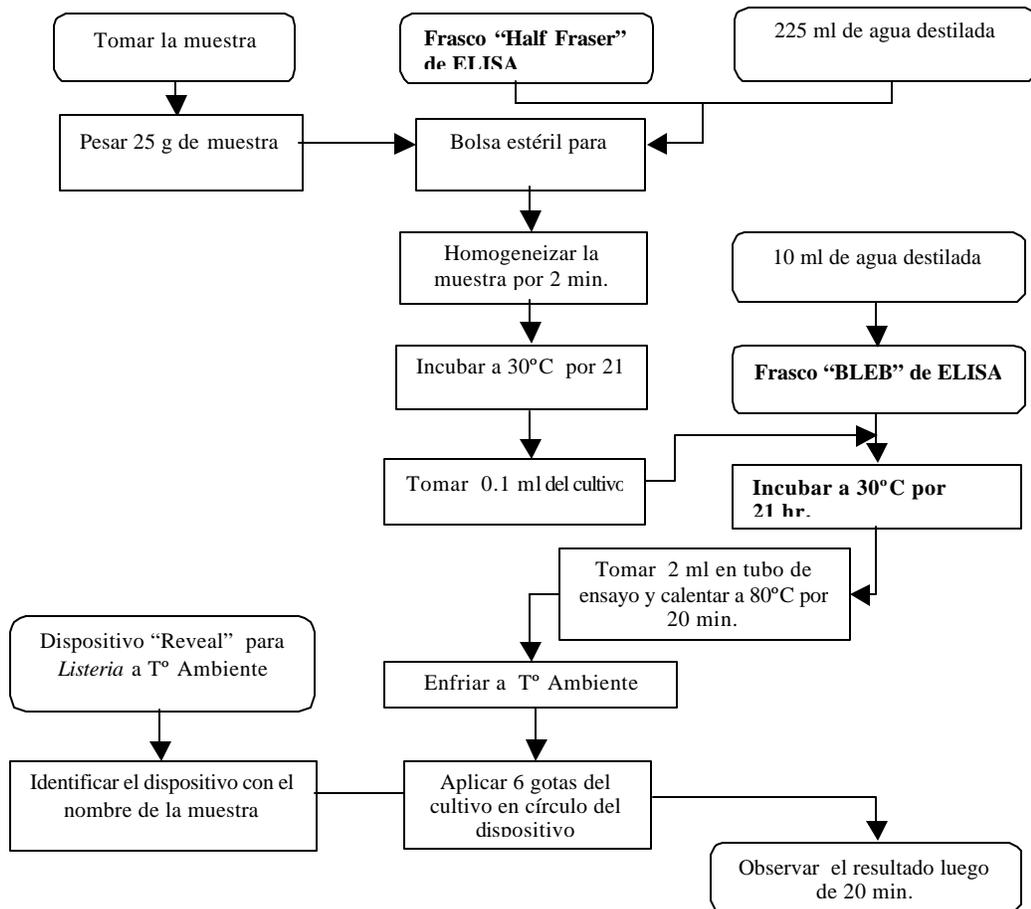


Figura 2. Flujograma de ELISA para detección de *Listeria*.

Anexo 6. Procedimiento de ELISA para detección de *Salmonella*.

Preparación y enriquecimiento de la muestra:

1. Hidratar un frasco de “Revive” con 200 ml de agua destilada estéril a 42°C en una bolsa stomacher. Agregar 25 g (o 25 ml) de muestra y homogeneizar en el Stomacher por dos minutos. Incubar la bolsa a 36°C entre dos y cuatro horas.
2. Hidratar un frasco de “Selenito-cistina” con 200 ml de agua destilada estéril a 42°C. Retirar la bolsa stomacher de la incubadora y adicionar a éste el medio “Selenito-cistina” hidratado. Incubar la bolsa 42°C entre 18 y 24 hr.

Uso del dispositivo Reveal:

1. Sacar el dispositivo del refrigerador para que se mantenga a temperatura ambiente e identificarlo correctamente antes de usarlo.
2. Con el gotero plástico transferir 5 gotas del tubo de ensayo al puerto del dispositivo y observar los resultados durante 15 min. Observaciones después de este tiempo pueden dar resultados incorrectos.

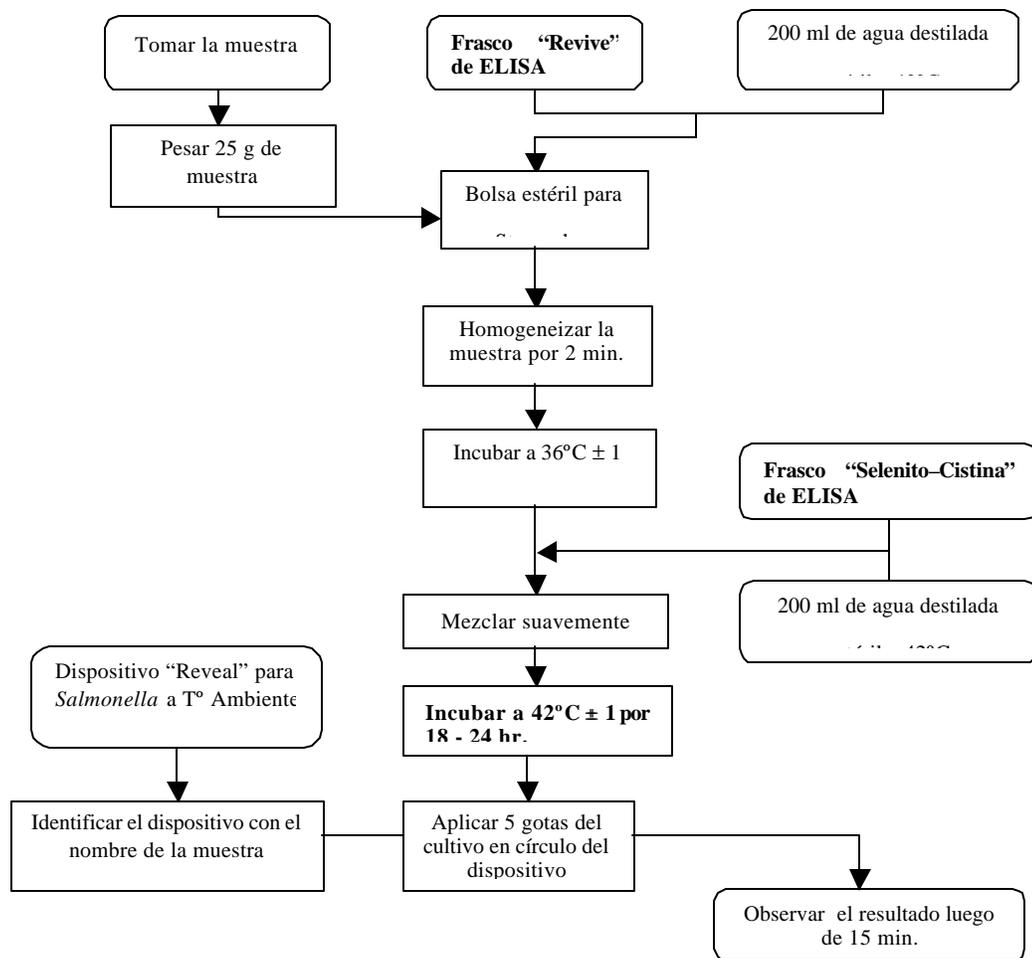


Figura 3. Flujograma de ELISA para la detección de *Salmonella*

Anexo 7. Procedimiento de los cálculos estándares en placa para la enumeración de microorganismos.

1. Desinfectar el área de trabajo con fenol o formaldehído.
2. Derretir el medio de cultivo en agua hirviente, luego colocar en baño de agua a 45°C.
3. Ajustar la temperatura del agua de dilución entre los 15 y 25°C.
4. Identificar los platos de petri indicando el número de la muestra, el factor de dilución y la fecha.
5. Agitar la muestra en caso de tratarse de un producto líquido.
6. Desinfectar con alcohol al 70% el extremo del recipiente por donde va a ser abierto el producto.
7. Tomar 25 ml o 25 g de la muestra dependiendo si el producto es líquido o sólido respectivamente y diluirla en 225 ml de agua de dilución para obtener una dilución de 1:10.
8. Transferir un mililitro de esta dilución a un frasco con 99 ml de agua de dilución para obtener un factor de 1:1000. De la misma manera continuar realizando las diluciones necesarias hasta obtener el factor de dilución adecuado para la muestra.
9. Preparar el número de diluciones de tal manera que en un plato de petri el número de colonias bacterianas fluctúe entre 25 y 250.
10. Transferir un mililitro de cada una de las diluciones a los platos de petri debidamente identificados utilizando una pipeta para cada dilución. Realizar estas siembras por duplicado.
11. Agregar entre 15 y 20 ml del medio de cultivo a 45°C en cada plato. Para mesófilos aerobios y psicrófilos se debe utilizar el medio PCA (Plate Count Agar), para coniformes totales se requiere VRBA (Violet Red Bile Agar) y para hongos se utiliza PDA (Papa Dextrosa Agar).
12. Mezclar el medio de cultivo con la muestra de forma lenta con cinco movimientos rotativos en dirección de las agujas del reloj, cinco en sentido contrario, cinco en línea recta de izquierda a derecha y finalmente cinco en la forma que se inició el mezclado.
13. Dejar los platos en reposo hasta que los medios solidifiquen. En el caso del VRBA se debe colocar otra capa de medio después de que la primera solidifique para favorecer las condiciones anaerobias que requieren estos microorganismos.
14. Invertir los platos, excepto los de PDA, para evitar que el agua de condensación facilite el crecimiento de colonias esparcidas debido a la alta humedad
15. Incubar a la temperatura requerida para cada tipo de microorganismos:
 - a. Para mesófilos aerobios totales: 35–37°C por 24-48 horas.
 - b. Para coliformes totales: 35° por 24 horas.
 - c. Para hongos: a T° Ambiente por 2-5 días.
 - d. Para psicrófilos: 4°C por 4-5 días.

Se debe llevar siempre un control del medio de cultivo (placa de petri solamente con el cultivo) y un control del agua de dilución (placa de petri con medio de cultivo y agua de dilución)

Fuente: Vanderzant y Splittstoesser, 1992

**Anexo 8. Normas establecidas por la División de Control de Alimentos del
Ministerio de Salud Pública de Honduras**

Cuadro 20. Normas microbiológicas para cómputos estándares en placa.

Productos	Análisis microbiológico					
	Mesófilos aerobios		Coliformes totales		Mohos/levaduras	Psicrófitos
	UFC/ml	UFC/g	UFC/ml	UFC/g	UFC/g	UFC/g
Leche semi descremada	50,000		30			
Leche chocolate	100,000		30			
Helado		50,000		100-1,000		
Crema ácida				100	100	
Queso Cabaña					10	100
Queso Crema				30	100	
Jamón Virginia				100		
Jamon de cerdo				100		
Salami imperial				100		
Mortadela				100		
Chorizo español				100		
Hot-dog				100		

Anexo 9. Procedimiento del Número Más Probable para el aislamiento de *E. coli*.

Materiales y reactivos:

1. Placas de petri estériles
2. Baño maría u horno para temperar el agua a 45° C
3. Mecheros
4. Incubadora a 35° C
5. Pipetas de 1 y 10 ml
6. Cuatro tubos con 9 ml de agua peptonada al 0.1%.
7. 12 tubos con 10 ml de caldo Laurel Triptosa con campana de Dirham.
8. Fenol o formaldehído
9. Alcohol etílico al 70%.
10. 12 tubos con caldo Bilis lactosa verde brillante 2% (BRILLA) con campana de Dirham.
11. Placas con Agar Violeta Rojo Bilis (VRBA).
12. Placa con Agar Eosina azul de metileno (EMB) y Agar nutriente en tubo

Procedimiento

Prueba presuntiva:

1. Mezclar bien la muestra. Realizar la diluciones 10-1 hasta 10-3. En caso de sospechar una mayor carga microbiana realizar más diluciones.
2. Tomando las pipetas estériles, inocular los tubos con caldo Lauril Triptosa (LST) con un mililitro de cada dilución de la muestra.
3. Homogenizar rotando los tubos entre las palmas de las manos.
4. Incubar los tres sets de tres tubos por 24-48 horas a 35° C.
5. Examinar los tubos a las 24 horas para observar formación de gas. Esto indica que el tubo es positivo
6. Después de la primera lectura, reincubar los tubos negativos por 24 horas adicionales.
7. Observar producción de gas en cualquier cantidad.
8. Agitar cada tubo de caldo LST con producción de gas y transferir una asada de la suspensión al tubo con caldo BRILLA para coliformes totales. Marque convenientemente los tubos para poder detectar fácilmente la dilución a la que corresponde.
9. Incubar por 48 horas a 35° C.
10. Tomar una asada de los tubos con caldo BRILLA positivos e inocular en un medio con EMB. Esta placa se incuba por 24 horas a 35° C.
11. Realizar la identificación por medio de pruebas bioquímicas de las colonias sospechosas aisladas en la placa.

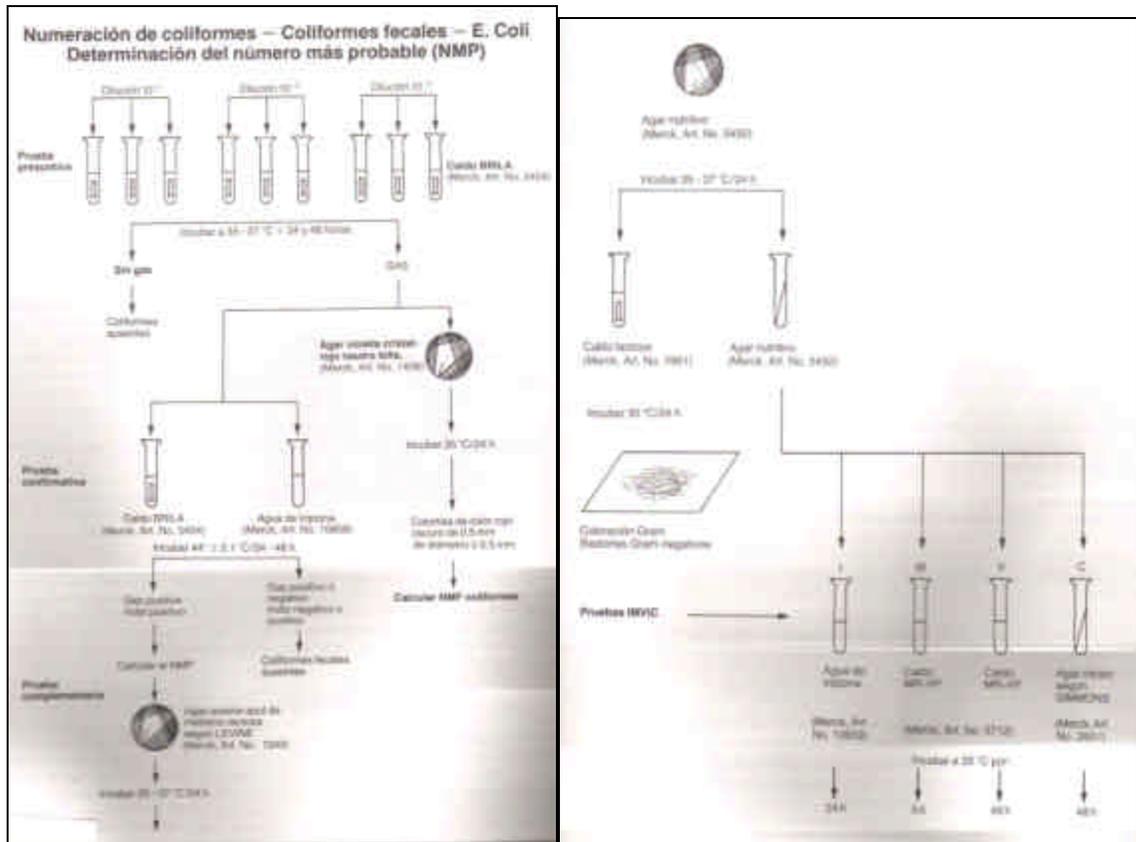


Figura 4. Diagrama de flujo del Método del Número Más Probable.

Fuente: Ratto, 1982

Anexo 10. Procedimiento para el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp.

1. Tomar 25 ml o g de la muestra según sea líquido o sólido respectivamente y adicionar 225 ml de caldo Lactosa o agua peptonada amortiguada.
2. Inocular un mililitro del cultivo efectuado en 10 ml de caldo Selenito-Cistina y en 10 ml de caldo Tetracionato. Incubar a 35-37°C durante 18-24 horas.
3. Se puede inocular 10 ml en 100 ml de Caldo Tetracionato llevado a incubación en baño de agua a 42-43°C durante por lo menos 24-48 horas y 10 ml en 100 ml de caldo Selenito-Cistina llevado a incubación a 37°C durante por lo menos dos días.
4. transferir una asada de cada uno de los dos medios selectivos a la superficie de una placa con medio Agar Verde Brillante y Agar Salmonella-Shigella.
5. Realizar la identificación de Salmonella que incluye tres fases:
 - a. Comprobación de las colonias seleccionadas mediante pruebas bioquímicas.
 - b. Identificación serológica por medio de antisueros.
 - c. Tipificación de bacteriofagos

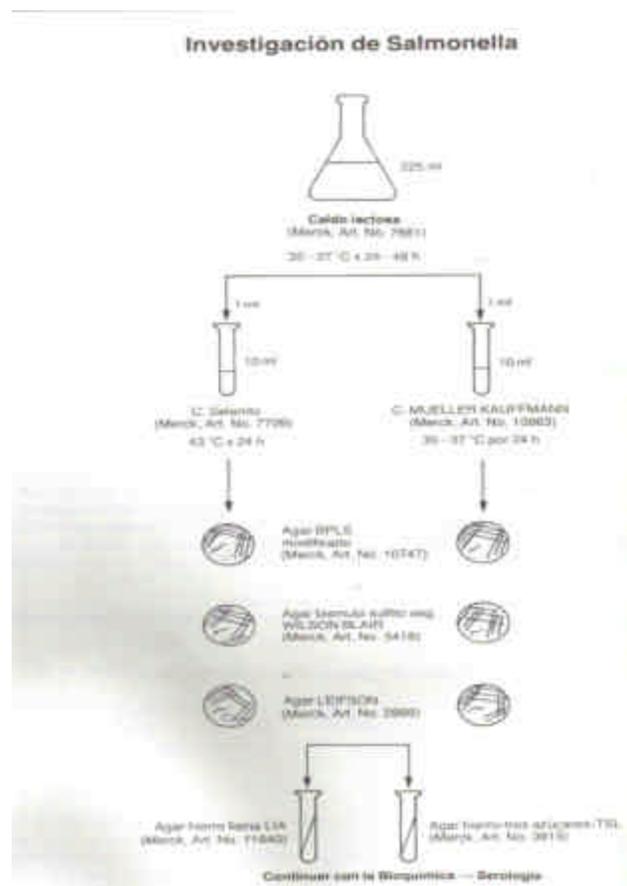
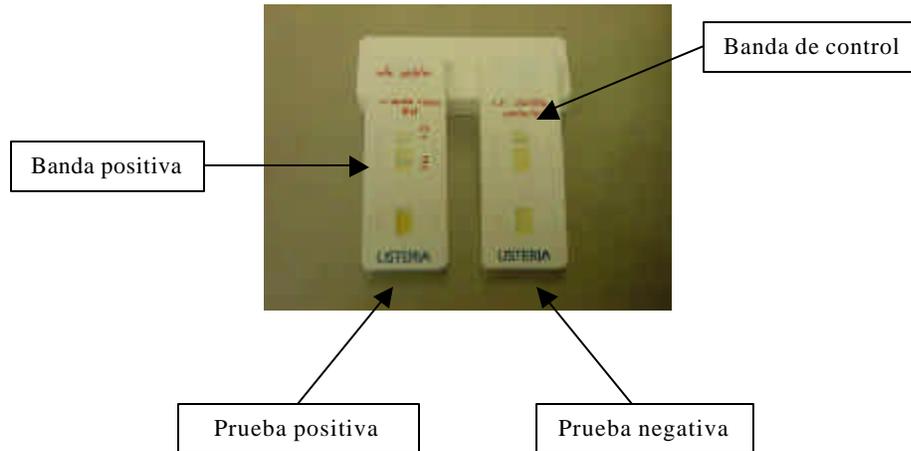


Figura 5. Diagrama de flujo del Método convencional para aislamiento de *Salmonella*

Fuente: Ratto, 1982.

Anexo 11. Muestra de crema ácida positiva para *Listeria* spp. con prueba de ELISA.



Anexo 12. Análisis de ambiente de la planta de lácteos

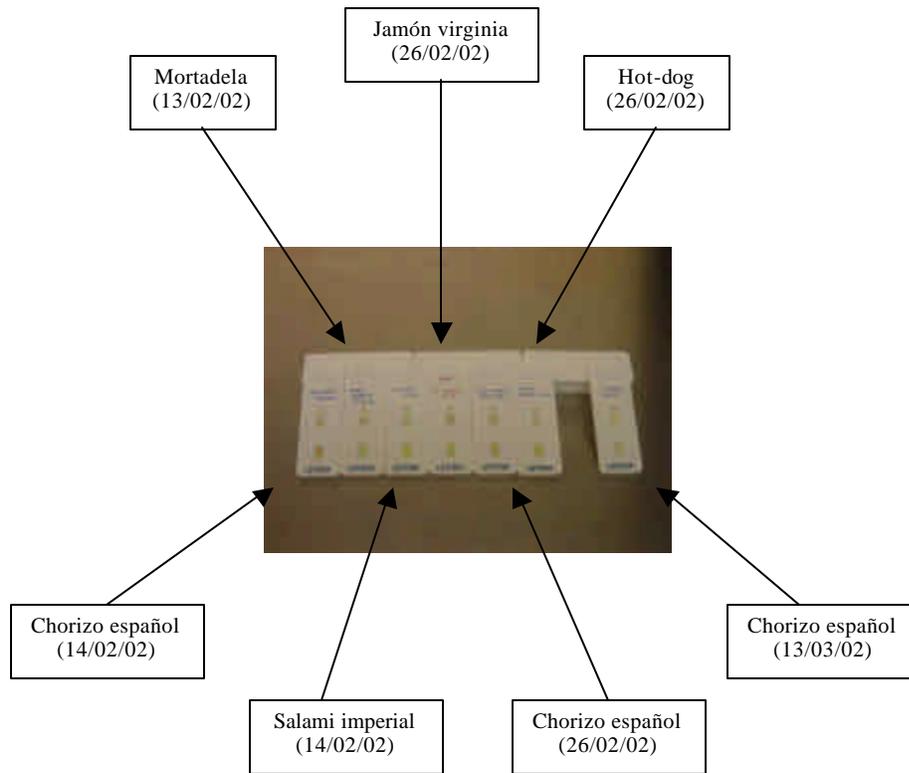
Cuadro 21. Muestreo ambiental de la planta de lácteos

PCA	26-May	29-May	2-Jun	Promedio	Resultado	Muestreo ambiental	
Lab. 1	48	21	11	26.7	Insuficiente	UFC	Clase
Lab. 2	Inc.	59	16	Inc.	Muy malo	0-3	Bueno
Proc. 1	16	103	3	40.7	Malo	4-9	Suficiente
Proc. 2	22	120	4	48.7	Malo	10-29	Insuficiente
PDA	26-May	29-May	2-Jun	Promedio	Resultado	30-90	Malo
Lab. 1	10	19	11	13.3	Insuficiente	>90	Muy malo
Lab. 2	33	37	14	28.0	Insuficiente		
Proc. 1	24	22	14	20.0	Insuficiente		
Proc. 2	47	42	9	32.7	Malo		
VRBA	26-May	29-May	2-Jun	Promedio	Resultado		
Lab. 1	0	0	0	0.0	Bueno		
Lab. 2	0	0	1	0.3	Bueno		
Proc. 1	0	0	0	0.0	Bueno		
Proc. 2	0	0	0	0.0	Bueno		
Referencias							
Lab. 1	Laboratorio enentre oficina y laboratorio principal.						
Lab. 2	Laboratorio principal con muebles deenseñanza.						
Proc. 1	Salón de proceso cerca de los cuartos fríos.						
Proc. 2	Salón de proceso cerca de los baños y vestidores.						

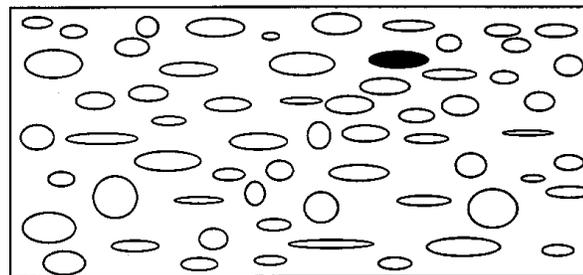
Inc. Número incontable de colonias

Fuente: Romero, 2000

Anexo 13 Muestras de productos cárnicos positivas para *Listeria* spp. con las pruebas de ELISA



Anexo 14. Distribución de los microorganismos patogénicos en un alimento contaminado.



○ Microorganismos no patogénicos

● Microorganismos patogénicos

Tabla de resultados para identificación de enterobacterias por el sistema API 20E.

TABLA DE LECTURA					
TESTS	SUBSTRATOS	CANT	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	orto-nitro-fenil-β-D-galactopiranosido (ONPG)	0,23 mg	beta-galactosidasa	incoloro	amarillo (1)
	isopropil-beta-galactopiranosido (IPTG)	7,6 µg			
ADH	arginina	1,9 mg	arginina dehidrolasa	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	incoloro / grisáceo	depósito negro / línea negra
URE	urea	0,76 mg	ureasa	amarillo	rojo / naranja (2)
TDA	triptofano	0,38 mg	triptofano desaminasa	TDA / inmediato amarillo / marrón rojizo	
IND	triptofano	0,19 mg	producción del indol	JAMES / inmediato incoloro / verde pálido / amarillo / rosa	
[VP]	cefalina piruvato sódico	0,38 mg 1,9 mg	producción de acetoina	VP 1 + VP 2 / 10 min incoloro / 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 gna
MAN	manitol	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
INO	inositol	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
SCR	sorbitol	1,9 mg	fermentación / oxidación (4)	azul / azul verdoso	amarillo
RHA	rabinosa	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	NT 1 + NT 2 / 2-5 min amarillo / rojo	
			reducción a gas N ₂	Zn / 5 min naranja rojo / amarillo	
MOB	API M Medium o microscopia		movilidad	inmovil	movil
McC	medio MacConkey		crecimiento	ausencia	presencia
OF-F OF-O	glucosa (API OF Medium)		cerado: fermentación abierto: oxidación	verde verde	amarillo amarillo

- (1) Un amarillo muy pálido debe considerarse como positivo.
 (2) Un color naranja que aparece después de 30-48 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
 69250 Marcy-l'Étoile / France
 tél. (33) 04 78 87 20 00 / fax (33) 04 78 87 20 90
<http://www.biomerieux.com>

bioMérieux, Inc.
 595 Anglum Road, Hazelwood,
 Missouri 63042-2320 / USA
 tel. (1) 314-731-8500 / fax (1) 314-731-8700

Impreso en Francia

Anexo 16. Modelo de la etiqueta recomendada para el manejo apropiado del producto por parte del consumidor.

Ejemplo de una etiqueta para el chorizo español.

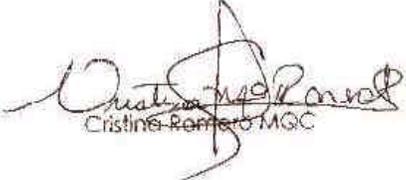
Instrucciones para el manejo de este producto:

Este producto ha sido elaborado con carne de res y cerdo inspeccionada y aprobada. Sin embargo, para evitar daños en el producto y proteger su salud, siga las siguientes instrucciones de manejo.

- 1. Mantenga el producto en refrigeración a 4°C, o congelado.**
- 2. Mantenga los productos cárnicos separados de otros alimentos.**
- 3. Lave bien los utensilios y la superficie donde va a preparar el producto.**
- 4. Cocine a una temperatura interna de 72°C.**
- 5. Si no ha consumido todo el producto, refrigere el residuo inmediatamente.**
- 6. Una vez abierto el empaque, consuma el producto dentro de los siguientes 7 días**

Este es un modelo base, el cual puede variar dependiendo del producto en el que se vaya a utilizar.

Anexo 17. Resultado de confirmación de *Listeria monocytogenes* en muestra de chorizo español.

	AGROBIOTEK LABORATORIOS		Apartado Postal 4461, Tegucigalpa, Honduras, C.A. Tel: (504) 238-0872; Fax: (504) 232-0758, Tegucigalpa Tel: (504) 552-8909; Fax: (504) 552-7118; San Pedro Sula abt@hondadata.com												
	ANALISIS DE LABORATORIO INFORME DE RESULTADOS														
Remite: Dra. Elsa Barrientos Empresa: El Zamorano	Fecha: 06 de Abril, 2002														
Fecha de Toma de Muestras: 27 de Marzo, 2002 Análisis solicitados: Investigación de Especie de <i>Listeria</i>															
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Código</th> <th>Muestra</th> <th>Análisis</th> <th>Resultados</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>280-02T</td> <td>Chorizo Zamorano</td> <td><i>Listeria</i> sp</td> <td>POSITIVO</td> </tr> <tr> <td colspan="3">IDENTIFICACION DE ESPECIE:</td> <td><i>Listeria monocytogenes</i></td> </tr> </tbody> </table>	Código	Muestra	Análisis	Resultados	280-02T	Chorizo Zamorano	<i>Listeria</i> sp	POSITIVO	IDENTIFICACION DE ESPECIE:			<i>Listeria monocytogenes</i>			
Código	Muestra	Análisis	Resultados												
280-02T	Chorizo Zamorano	<i>Listeria</i> sp	POSITIVO												
IDENTIFICACION DE ESPECIE:			<i>Listeria monocytogenes</i>												
 Cristina Romero MGC			 AGROBIOTEK Laboratorios S. de R. L.												
<hr/> BIOTECNOLOGIA AL SERVICIO DE LA AGROINDUSTRIA															