

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



DETERMINACIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN DOS VARIEDADES DE QUESOS ARTESANALES, COMERCIALIZADOS EN LOS MERCADOS LA TIENDONA, CENTRAL Y SAN MIGUELITO.

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:**

MAYRA CLARIBEL CORTEZ HERNANDEZ

ANDI ESMERALDA SANCHEZ GONZALEZ

**PARA OPTAR AL GRADO DE**

LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

OCTUBRE 2015

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

**RECTOR**

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

**SECRETARIA GENERAL**

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANA**

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

**SECRETARIO**

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LÓPEZ.

## **DIRECCIÓN DE PROCESO DE GRADUACIÓN**

### **DIRECTORA GENERAL**

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

### **TRIBUNAL EVALUADOR**

#### **COORDINADORAS DE ÁREA: MICROBIOLOGÍA**

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

### **DOCENTE ASESORA**

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez.

## **DEDICATORIA**

Quiero agradecer a Dios y a la virgencita de Guadalupe por darme fortaleza e iluminarme.

A mi abuela María del Carmen Sánchez Méndez, por sus consejos; sus cuidados día con día diciéndome no te rindas a lo largo de mi vida y carrera, así como mi hermana Dinora Patricia Sánchez González.

Mi madre Paula Sánchez de Agustín y padre Bernardo Agustín León por todo su apoyo incondicional y ser el pilar en toda mi vida y carrera.

A mis compañeras, amigas ahora colegas Mayra, Silvia Mendoza, Helen Laínez.

A mis maestros y maestras que desde el inicio de este caminar de aprendizaje de toda mi vida desde el primer grado hasta mis asesores final de mi tesis por todos sus conocimientos y transmitírmelos.

A mi amiga, compañera de tesis por su apoyo al 100% para poder culminar mi trabajo de graduación.

Andi Esmeralda Sánchez González.

## **DEDICATORIA**

Le agradezco a Dios todo poderoso, que me fortaleció e ilumino en los momentos más difíciles.

A mi madre Marta Merino que siempre estuvo en los momentos más difíciles apoyándome para terminar mi carrera que dios la guarde siempre.

A mis hijos Carlos y Ángel valle que han sido el motor de todos mis esfuerzos, que han llenado mi vida de alegría y gracias a ellos pude llegar a culminar mi carrera, los amo.

A mi hija Sofía valle aunque su instancia fue corta, lleno todo mi corazón y fue mi inspiración a seguir adelante, que el Señor todo poderoso la tenga en su gloria siempre te llevare en mi corazón te amo hija.

A mi esposo Juan Carlos Valle que en los momentos difíciles estuvo apoyándome y dándome ánimos, lo amo.

A mi compañera de tesis que es mi amiga por apoyarme y aguantarme en todo este tiempo, te agradezco un montón que Dios te bendiga.

A todas mis amigas que siempre estuvieron con migo apoyándome y dándome ánimos para seguir adelante, muchas gracias

Mayra Claribel Cortez Hernández.

## INDICE.

	Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xviii
Capítulo II	
2.0 Objetivos	21
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	23
3.1 Leche de vaca	23
3.2 Clasificación de leche de vaca	25
3.3 Principales fuentes de contaminación	26
3.4 Normas para determinar la calidad de la leche	29
3.5 Requisitos generales de la leche de vaca como materia prima para la fabricación de quesos	29
3.6 Quesos	30
3.7 Clasificación de los quesos	31
3.8 Quesos según el grado de maduración	32
3.9 Proceso para la elaboración de queso fresco	36
3.10 Mecanismo de la coagulación enzimática de quesos	36
3.11 Fabricación de quesos	39
3.12 Procesos básicos en la fabricación de quesos	39
3.13 Microorganismos presentes en la leche de vaca y sus derivados.	39
3.14 <i>Listeria monocytogenes</i>	44
3.14.1 Características	45
3.14.2 Tratamiento	46

## INDICE.

	Pág.
3.14.3 Resistencia antibiótica	47
3.14.4 Alternativas	47
3.14.5 Profilaxis	48
3.14.6 Identificación microbiológica	49
Capítulo IV	
4.0 Diseño metodológico	52
4.1 Tipo de estudio	52
4.2 Investigación bibliográfica	52
4.3 Investigación de campo	53
4.4 Determinación y selección de los quesos a muestrear	55
4.5 Parte experimental	58
4.5.1 Tratamiento de muestras de queso fresco y duro blando	58
4.5.2 Aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	58
4.5.3 Identificación de <i>Listeria. Monocytogenes</i>	59
4.6 Evaluación de sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i>	65
Capítulo V	
5.0 Resultados	69
5.1 Guía de observación	69
5.2 Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	74
5.3 Resultados obtenidos para la sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i>	77
5.4 Comparación de los conteo en placa de 1 día y a los 5 días	78

## INDICE

	Pág.
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	85
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	87
Bibliografía	89
Glosario	
Anexos	



## INDICE DE ANEXO

### ANEXO N°

1. Guía de observación.
2. Especificaciones microbiológicas para quesos frescos y duros blandos establecidos por el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08
3. Listado de los mercados municipales del área metropolitana San Salvador.
4. Procedimientos analíticos.
5. Resultados de *Listeria monocytogenes*.
6. Materiales y equipos.
7. Códigos de las muestras de los quesos.
8. Medios y reactivos.
9. Registros de la temperatura de la refrigeradora.
10. Procedimiento enumeración *Listeria monocytogenes*

## INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	Pág.
1. Composición química global de un litro de leche de vaca.	24
2. Clasificación de quesos	34
3. Tipos de microorganismos presentes en la leche que ocasiona problemas en la elaboración de quesos.	42
4. Porcentaje de cada estrato	54
5. Calculo de puestos a muestrear.	55
6. Número de puestos a muestrear.	56
7. Características típicas de colonias.	59
8. Resultados esperados de <i>L. monocytogenes</i> .	64
9. Características físicas y organolépticas de los quesos.	67
10. Tipos de quesos en los mercados existentes.	69
11. Quesos más comercializados y preferidos por los consumidores	70
12. Puestos de los mercados que mantienen en refrigeración los quesos.	71
13. Medidas higiénicas tomadas en los puestos de los mercados para los quesos	72
14. Resultados obtenidos para la identificación de <i>L. monocytogenes</i> , primer muestreo	74
15. Resultados obtenidos para la identificación de <i>L. monocytogenes</i> , segundo muestreo	75
16. Resultados obtenidos para la identificación de <i>L. monocytogenes</i> , tercer muestreo	76
17. Características físicas y organolépticas de los quesos frescos.	77

## INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	Pág.
18. Características físicas y organolépticas de los quesos duros blandos.	77
19. Resultados de los conteos en placa de <i>Listeria</i> spp los días 1 y 5.	78
20. Número total de colonias positivas de <i>L. monocytogenes</i> del día 1.	80
21. Número total de colonias positivas de <i>L. monocytogenes</i> del día 5.	81

## INDICE DE FIGURAS.

FIGURA N°	Pág.
1. <i>Listeria monocytogenes</i> .	43
2. Diagrama de flujo para la investigación	57
3. Datos de los quesos que poseen los puestos de los diferentes mercados.	70
4. Tipos de quesos preferidos por los consumidores.	71
5. Quesos que se mantienen en refrigeración en los puestos de los mercados.	72
6. Primeras muestras positivas de <i>L. monocytogenes</i> .	82
7. Segunda muestras positivas de <i>L. monocytogenes</i> .	82
8. Tercera muestras positivas de <i>L. monocytogenes</i> .	82

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

°C: grados Celsius.

API: sistema de identificación API listeria.

BAM: Manual de Análisis Bacteriológico.

c: prueba del CAMP.

C: mercado Central.

CC: centímetro cúbico.

CAMP: prueba Christie – Munch – Peterson.

CENSALUD: Centro de Investigación y Desarrollo en Salud.

cm: centímetros.

CT: catalasa.

EST: extracto seco total.

FDA: Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos.

FC: fermentación de carbohidratos.

g: gramos.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogeno.

H: hemólisis.

HTST: alta temperatura en corto tiempo.

INDOL: triptona – peptonada.

M: motilidad.

NMP: número más probable.

NSO 67.01.01:06: productos lácteos leche cruda de vaca. Especificaciones.

O: Oxford.

P: palcam.

RM: prueba de rojo de metilo.

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano.

Sm: mercado San Miguelito.

T: mercado la Tiendona.

TSAYe: agar tripticasa soya + 0.6 % de extracto de levadura.

TSBye: caldo tripticasa soya + extracto de levadura.

TSI: triple azúcar hierro.

TG: tinción al gram.

LEB: caldo de enriquecimiento para Listeria.

LI: iniciativa Listeria

*L. monocytogenes*: *Listeria monocytogenes*.

VP: Prueba de Voges - Proskauer.

APPCC: Análisis de peligros y puntos de control críticos.

## RESUMEN.

El queso es un material alimenticio en el cual crecen los microorganismos, es un medio de cultivo, por lo que en este producto crecen todo tipo de bacterias en especial la *Listeria monocytogenes*. En el presente trabajo se realizó un análisis microbiológico a dos variedades de quesos (fresco y duro blando), comercializado en los mercados de la Tiendona, Central y San Miguelito. Se tomó en cuenta los parámetros utilizados dentro del Reglamento Técnico Centro americano (RTCA) 67.04.50:08 (Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos) de quesos madurados y no madurados el cual dice que por cada 25 g de muestra, la *Listeria monocytogenes* debe ser “ausente”.

Para determinar las dos variedades de quesos se utilizó una guía de observación, para determinar la presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* se analizó por medio de la metodología descrita por el BAM (Manual de Análisis Bacteriológico de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA)). Se realizó un conteo en placa para la determinación de la sobrevivencia de la *L. monocytogenes*; haciendo una comparación del día 1 y a los 5 días, sometiendo la bacteria a ciertas condiciones de temperatura. Todos los análisis respectivos fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador

Los resultados obtenidos de los análisis, demostraron que el 25% de las dos variedades de quesos analizados no cumplen con los parámetros requeridos del RTCA (67.04.50:08), se demostró que la *L. monocytogenes* sobrevive a condiciones de temperatura de 4 °C.

Se consideró que los quesos fresco y duro blando no son aptos para el consumo humano, se recomienda que el ministerio de salud aumente el monitoreo y de capacitaciones para mejorar las condiciones higiénicas en los puestos de los mercados, además de supervisar que empleen leche pasteurizada en la elaboración de queso así como prohibir el consumo de quesos de dudosa procedencia.



**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## I. INTRODUCCION

La leche de vaca es empleada mayoritariamente en la elaboración de productos lácteos, entre los cuales se encuentran los quesos (fresco y duro blando), los cuales son preferidos por la población salvadoreña, por ser importante en la dieta diaria y accesible para cualquier nivel económico.

Debido a que en el país su producción es artesanal o semi-artesanal, se vuelven susceptibles a microorganismos patógenos y a recuentos permitidos en ocasiones por bacterias oportunistas como *Listeria monocytogenes*, que es un microorganismo poco común, al ingerir estos productos contaminados con dicha bacteria puede desarrollarse la Listeriosis, con manifestaciones a nivel gastrointestinal y a nivel del sistema nervioso central en casos severos; siendo la población más afectada mujeres embarazadas, personas sometidas a dietas rigurosas, infantes, ancianos e inmune suprimidos <sup>(11)</sup>

Para la elección de las dos variedades de quesos se utilizó una guía de observación, la cual nos determinó los quesos más consumidos por la población salvadoreña.

En la presente investigación se verifico la ausencia o presencia de *Listeria monocytogenes*, mediante lo especificado en el Manual de Análisis Bacteriológico (BAM) de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos, para su aislamiento e identificación convencional se comparó con el RTCA No. 67.04.50:08 (Alimentos, criterios microbio-lógicos para la inocuidad de alimentos) de quesos madurados y no madurados.

Para la obtención de las muestras de quesos se utilizó el muestreo estratificado simple, dichas muestras serán tomadas aleatoriamente de los mercados La Tiendona, Central y San Miguelito.

También se verificó la sobrevivencia de la *L. monocytogenes*, se utilizó los parámetros de recuento en placa del día uno y se comparó con el recuento en placa del día cinco para ver la diferencia, si la bacteria prolifera a bajas temperaturas.

Los análisis correspondientes se realizaron en los meses de julio a diciembre del año 2013 en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), de la Universidad de El Salvador, para evaluar si estos quesos son aptos para el consumo humano.

**CAPITULO II**  
**OBJETIVOS.**

## II. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar *Listeria monocytogenes* en dos variedades de quesos artesanales, comercializados en los mercados La Tiendona, Central y San Miguelito.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 realizar por medio de una guía de observación las dos variedades de quesos más consumidos por la población y obtener los quesos seleccionados para el análisis.
- 2.2.2 Identificar la presencia o ausencia *Listeria monocytogenes* de las muestras seleccionadas.
- 2.2.3 Evaluar la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* del conteo en placa a los cinco días de las muestras seleccionadas, que resultaron positiva y comparar con el resultado del conteo en placa inicial.
- 2.2.4 Comparar los resultados microbiológicos obtenidos con el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 67.04.50:08 (Alimentos, criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos) de quesos madurados y no madurados.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEORICO.**

### 3.0. MARCO TEORICO.

#### 3.1 LECHE DE VACA

La definición fisiológica de la leche de vaca no basta para evaluar la calidad de la leche cruda, desde el momento que se considera como materia prima para el abastecimiento de unidades industriales deben considerarse las variaciones de composición debida a los factores humanos que influyen en su manejo y producción, o debido a las condiciones climáticas y factores fisiológicos normales de los animales que intervienen en la secreción determinan desde luego la necesidad de adoptar una clasificación que le permita apreciar las leches según sus características propias y según el valor que puedan tener en relación a la utilización que se les pretende dar (22).

La leche de vaca desde el punto de vista legal se define como “una secreción láctea completa y fresca, obtenida por el ordeño completo de una o varias vacas, excluyendo la extraída 15 días anteriores y 5 días posteriores al parto; el tiempo más largo que se considera necesario para que la leche esté exenta de calostro” (23).

Debido a la gran complejidad que presenta la leche puede además definirse físico-químicamente como un sistema heterogéneo formado por diferentes fases en equilibrio inestable. Según la definición anterior, la leche es en parte una solución acuosa verdadera, que contiene moléculas (la lactosa) o iones (calcio) disueltos, esta fase es estable. Además también incluye soluciones coloidales, inestables por naturaleza constituidas por dos tipos de coloide: las albúminas y las globulinas, las moléculas poliméricas son coloides moleculares relativamente estables puesto que son hidrófilos. Pero existe un compuesto salino de fosfato de calcio  $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$  asociado a un compuesto orgánico de caseinato de calcio que es un coloide muy inestable. Este micelio fosfocálcico.

Es un agregado macromolecular de forma y masa variable que en la leche de vaca fresca está cargado negativamente. La repulsión electrostática resultante entre los micelios, asegura su estabilidad y evita su agregación.

Por otra parte la estabilidad de la leche puede ser alterada debido en la mayoría de los casos a la acidificación debido a bacterias lácticas o por proteólisis debido a bacterias psicótrofas (23).

### COMPOSICIÓN QUÍMICA GLOBAL:

Cuadro Nº 1. Composición química global de un litro de leche de vaca (13,42).

Composición	Constituyentes	Cantidad en g/L
<b>Agua</b>	Oxígeno, hidrogeno	902.0
<b>Glúcidos</b>	Lactosa	42.0
<b>Materia Grasa</b>	Lípidos. fosfolípidos y otros compuestos Liposolubles	39.0
<b>Materia nitrogenada</b>	Proteínas, Caseínas y otras proteínas liposolubles	33.0
<b>Sales</b>	P, k, Ca, Na ,Cl y Mg	9.0
<b>Catalizadores</b>	Vitaminas y Enzimas	trazas
<b>Extracto seco total</b>	Todos los constituyentes menos el agua	130.0



### 3.2 CLASIFICACION DE LECHE DE VACA (27,32).

En la industria lechera se puede encontrar diferentes tipos de leche de acuerdo a sus propiedades y manejos que se le dé:

- Leche Fluida Entera: Producto integro no adulterado ni alterado del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de vaca sanas que no contengan calostro, y que está exento de color, sabor, olor y consistencia normal, dicha leche puede ser una de las fuentes más comunes de contaminación en la cual puede crecer la *L. monocytogenes*, ya que esta no sufre ningún tratamiento para la elaboración de los quesos frescos y duros blandos.
- Leche Condensada: A diferencia de la leche evaporada, la leche concentrada a azucarada no está estéril pero la multiplicación de las bacterias presentes en este producto se previene mediante la acción preservativa del azúcar, el producto se hace a base de leche pasteurizada, concentrada primero y luego suplementada con sucrosa. Se ajusta la concentración y la añadidura de azúcar, a fin de que está presente un 63% del volumen final, por lo que no ayuda este medio al crecimiento de la *L. monocytogenes*
- Leche evaporada: Es la forma de leche concentrada que más se usa. Se concentra hasta que su contenido de sólido sea aproximadamente 2.25 veces el de la leche entera natural, por la cantidad de calor a la que es sometida esta puede destruir el número de células de *L. monocytogenes*.
- Leche Pasteurizada: Es la leche a la cual se le ha eliminado cualquier organismo generador de enfermedades. La leche pasteurizada no está estéril, de manera que es preciso enfriarla rápidamente después de la pasteurización a fin de prevenir la multiplicación de las bacterias sobrevivientes, como lo es *L. monocytogenes* que debido a una mala pasteurización esta puede sobrevivir.

- Leche Entera en Polvo: Se deshidrata hasta el nivel de un 97% de sólidos mediante el secado, por atomización o en tambor, debido al alto grado de calor puede destruir el número de células de *L. monocytogenes* ya que no resiste a altas temperaturas.

### 3.3 PRINCIPALES FUENTES DE CONTAMINACION <sup>(21,40)</sup>.

Las fuentes de contaminación, alteraciones y defectos en la leche son múltiples; pero principalmente se consideran como origen más frecuentes.

- El ambiente: Las bacterias y otros microorganismos como *L. monocytogenes* se encuentran en el suelo, agua, aire; estas bacterias se depositan en el cuerpo de los animales y del hombre transportado por el aire. La atmósfera de los establos está siempre cargada de gérmenes y bacterias como la *L. monocytogenes*, estos son transportados por el polvo. El heno y la paja aportan sobre todo gérmenes esporulados; bacilos y clostridios. Los excrementos son ricos en gérmenes variados y constituyen la principal fuente de entero bacterias nocivas como la *E. coli* y la *L. monocytogenes*. Durante la manipulación de los forrajes, así como al hacer la limpieza y el barrido la atmosfera se carga de polvo con abundante gérmenes y bacterias, la contaminación de la leche contenida en recipientes abiertos es más intensa, el medio ambiente que se encuentra en la sala de recepción de las plantas procesadora de lácteos es capaz de contaminar la leche fresca, lista hacer sometida a tratamientos requeridos en el proceso
- El estado del animal: Las suciedades que se encuentran en la leche proceden frecuentemente de la caída, en el momento del ordeño, de partículas de excremento, tierra, vegetales, adherida a la piel del animal, así como también pelo y células epiteliales, todas estas partículas transportan bacterias como *L. monocytogenes*, que de esta manera ingresan a la leche, sobre todo en el ingreso manual y con el uso de recipiente de gran

cobertura. La reducción de esta contaminación es notable si se lava la mama con una solución antiséptica y se inmoviliza la cola. Además no basta que la res esté limpia por fuera, es preciso que esté sana libre de Tuberculosis, Brucelosis y Listeriosis.

- Limpieza y salud del personal: El hombre constituye una vía directa de contaminación de los alimentos, a través de las manos, las expectoraciones, ropa no adecuada, falta de gorro y mascarilla. Es de tomar en cuenta de que la limpieza y la salud de las personas que realizan el ordeño y las que manipulan la leche en las plantas procesadoras puede constituir una fuente de contaminación de *L. monocytogenes*, por lo tanto deben ser personas competentes en tanto a la salud se refiera.
- Calidad del agua: La calidad del agua tiene una gran importancia; las aguas impuras empleadas en el lavado de los recipientes, de las máquinas y especialmente la que se incorporan en los productos puede ser la causa de contaminaciones de bacterias *L. monocytogenes* muy perjudiciales.
- Limpieza de utensilios y maquinaria: Son habitualmente la forma de contaminación más importante. Son millares de gérmenes y bacterias como *L. monocytogenes* que pueden existir en las paredes de utensilios mal lavados y mal secados. La forma de los aparatos y de los equipos y pueden favorecer el desarrollo de microorganismos como *L. monocytogenes*; cuando estos poseen ángulos y rugosidades difíciles de lavar y desinfectar provocando la proliferación de bacterias. El uso de utensilios esterilizados es el factor más importante para producir leche con bajo contenido de bacteria. La limpieza es importante ya que esta minimiza la contaminación del proceso, la presencia de moscas y bacterias como *L. monocytogenes* son provocados por el mal manejo de la leche.

Debemos recordar que al igual que todos los alimentos, la leche y sus productos derivados tienen el potencial de causar enfermedades, transmitidas por bacterias como lo es *L. monocytogenes*, es por ello que se debe de garantizar la inocuidad de la leche y sus derivados mediante la aplicación de prácticas de higiene adecuadas desde la producción de materia prima hasta el producto final como lo es el queso (15).

**La higiene de los alimentos:** comprende todas las condiciones y medidas necesarias para asegurar la inocuidad y la aptitud de los alimentos en todas las fases de la cadena alimentaria, entendiendo por esta a la producción primaria, elaboración, almacenamiento, distribución de un alimento hasta el consumo final (9, 43).

Higiene de los alimentos como se mencionó antes consiste en prevenir la contaminación y el crecimiento de bacterias en los alimentos, en este caso de los quesos por bacterias de *L. monocytogenes*; la contaminación es introducida en el sistema de producción por vectores, las bacterias pueden producir toxinas o infectar a los consumidores con *L. monocytogenes*. El procedimiento para prevenir la contaminación consiste en controlar las temperaturas de almacenamiento de los quesos, impone asegurar la pasteurización de la leche, las bacterias pueden ser destruidas generalmente con bastante rapidez con temperaturas a 60°C; en este caso *L. monocytogenes* no resiste a temperaturas elevadas más de 45°C por lo que sería eliminada (15,43).

**La higiene general:** es el proceso de limpieza, la limpieza es importante porque incluso partículas microscópicas de suciedad pueden contener bacterias, la limpieza sistemática resulta necesaria para eliminar todo tipo de suciedad y de bacterias contaminantes como lo es *L. monocytogenes*. La higiene de los quesos depende de la limpieza de las manos, utensilios, equipo, ropa, medio ambiente en la zona de producción/ puestos de venta (15).

### **3.4 NORMAS PARA DETERMINAR LA CALIDAD DE LA LECHE** (3, 26,32).

De todos los productos alimenticios, la leche es uno de los más controlados legalmente en muchos países a nivel de latino América y Europa. El estándar mínimo de contenido graso debe ser por ley del 3.0-3.8%, debe poseer además un extracto seco total (EST) entre 11.2-12.3%, una acidez total titulable entre 13-20 mL de NaOH 0.1N, un rango de pH entre 6.5-6.7, una reductasa no menor a 2 horas y características organolépticas de la leche cruda.

### **3.5 REQUISITOS GENERALES DE LA LECHE DE VACA COMO MATERIA PRIMA PARA LA FABRICACIÓN DE QUESOS:**

La leche cruda destinada para elaborar quesos debe de presentar sus características propias, debido a que si no se tiene un control de calidad eficiente los microorganismos como los *Coliformes* (*Salmonella sp.* *Shigella sp.* *Escherichia coli*), *cocos* (*Staphylos* y *Streptos*) y *Bacillos* (*Micobacterium tuberculosis*) pueden transferirse a los quesos ya que una vez estos son elaborados ya no se pasteurizan, es decir, si la materia prima (leche) no cumple con las condiciones mínimas de inocuidad, el producto derivado final, en este caso los quesos, arrastrarán el contenido que esté presente en ella y éste puede ser desde todos sus nutrimentos, hasta todos los microorganismos patógenos que no hayan sido eliminados (23, 36).

Para elaborar un producto lácteo de gran calidad e inocuidad, las industrias deben considerar ciertos requisitos generales, válidos para lácteos:

- La leche, debe poseer un equilibrio normal de sales minerales, en especial de calcio.
- El contenido de caseína en la leche debe ser elevado.
- Una baja capacidad de acidificación en la leche, afecta el desuerado, durabilidad del queso, su consistencia y maduración.

- Sus características organolépticas deben ser normales, buen olor, color y sabor.
- La cantidad de microorganismos debe ser tan baja como sea posible, libre de microorganismos patógenos que aporten sustancias o toxinas que produzcan defectos en el queso.
- La leche debe estar exenta de materias o sustancias extrañas como: antibióticos, residuos de detergente, antisépticos u otro tipo de sustancias que inhiban el crecimiento microbiano (36).

### **3.6 QUESOS.**

Además de ser alimentos muy apetecibles que dan variedad y atractivo a nuestra dieta, los quesos han sido desde siempre una fuente importante de nutrientes en cualquier lugar donde se crían animales productores de leche. Pero existen países menos desarrollados donde la leche se altera rápidamente por falta de refrigeración en donde el queso podría ser un alimento básico de la dieta aunque se elabore bajo condiciones muy primitivas. Por esto los primeros intentos por conseguir un producto almacenable derivado de la leche dieron origen a una diversidad de productos y muy probablemente el queso surgió como resultado de estos intentos por conservar la leche (7,8, 20,21).

“Por queso se entenderá el producto fresco o maduro, sólido o semisólido”  
obtenido:

- a. Coagulando la leche, leche descremada, leche semidescremada, crema, crema de suero, suero de mantequilla o una combinación cualquiera de estas materias por la acción de cuajo u otros coagulantes apropiados, y escurriendo parte del suero que se produce como consecuencia de tal coagulación.

- b. Mediante técnicas de elaboración que comprenden la coagulación de la leche y/o de las materias obtenidas de la leche y que dan un producto final que posee las mismas características esenciales físicas, químicas y organolépticas que el producto definido directamente en el literal anterior” (8,21).

Existen muchas otras definiciones que aunque son muy amplias no abarcan a todos los quesos, ya que algunos se elaboran con las proteínas del suero de leche que queda después de aprovechar la caseína coagulada. Además se han utilizado grasa y proteínas vegetales para elaborar productos “parecidos” a los quesos, algunas de ellas se dan a continuación:

“Queso es todo producto elaborado a partir de la cuajada de la leche de vaca u otros animales; la cuajada se obtiene mediante la coagulación de la caseína por acción de una enzima (renina), un ácido (generalmente ácido láctico) y con o sin un tratamiento posterior de la cuajada por el calor, prensado salado y maduración (fermentación) con microorganismos seleccionados (32).

“Queso, es el producto fresco o maduro, sólido o semisólido, obtenido por la separación del suero después de la coagulación de la leche natural, descremada o semidescremada, de suero, mantequilla o una mezcla de estos productos”(9,41).

### **3.7 CLASIFICACIÓN DE LOS QUESOS.**

Hoy en día existen más de 800 variedades de queso, aunque muchos de ellos son en realidad productos similares elaborados con nombres diferentes. Las diferencias entre cada variedad están en el tamaño, forma, presentación, recubrimiento, tipo de leche empleada, apariencia, sabor, textura, composición, sistema de fabricación y de todos ellos solo hay básicamente 18 tipos naturales

que son realmente distintos y que reflejan los diversos procesos empleados en su elaboración<sup>(8, 21,36)</sup>.

Sin embargo es posible una clasificación en forma general de los tipos y variedades más importantes de quesos basados en su textura y en el tipo de maduración. Hay quesos duros, semiduros y blandos dependiendo de su contenido de humedad, y atendiendo a su maduración. Los hay madurados por bacterias, por mohos y sin madurar. Las bacterias pueden producir gas y formar ojos, como en el queso suizo y carecer de esta propiedad y no formar ojos como el cheddar. Entre los quesos blandos y semiblandos se encuentran los madurados por bacterias como el Limburguer y el Camembert por mohos; el queso fresco es un ejemplo de queso no madurado <sup>(36)</sup>.

### **3.8 QUESOS SEGÚN EL GRADO DE MADURACIÓN.** <sup>(23, 43)</sup>

No existe una tipificación única y sistemática que comprenda todas las variedades de queso. Por tal motivo se los clasifica sobre la base de distintos criterios.

- Si se atiende al uso, se subdividen en quesos de mesa, o de postre y quesos para rallar.
- Según la consistencia de la pasta, que depende del contenido de agua y del proceso de coagulación, se establecen las siguientes categorías:

#### **Quesos blandos:**

Se emplea poco cuajo en su coagulación. La pasta semisólida retiene aproximadamente hasta el 50% de agua.



**Quesos duros:**

Se coagulan con alta proporción de cuajo. Son de pasta compacta y seca, con aproximadamente el 30% de agua.

De acuerdo con el contenido de grasa, el cual se calcula en el extracto seco y no en el propio queso se conocen los siguientes tipos:

**Quesos no madurados:**

Los quesos frescos se caracterizan por su alto contenido de humedad que les confiere una textura suave. Se pueden elaborar a partir de leche entera, descremada y parcialmente descremada; no requieren de maduración, por lo tanto, están listos para el consumo inmediatamente después de elaborados. En el comercio estos quesos se encuentran en variadas presentaciones en cuanto a peso y forma. Ejemplos: queso crema, queso fresco y queso cremado

**Quesos madurados:**

Aquí se encuentran la mayor parte de los quesos, distinguiéndose de los quesos frescos porque sufren de forma progresiva y de un tiempo más o menos largo, complejas transformaciones bioquímicas. La maduración de estos tipos de quesos puede ser producida por bacterias o por hongos según el tipo a elaborar. Durante la maduración, la cuajada fresca se transforma en distintos productos más solubles. Por la naturaleza de los nuevos productos, su diversidad y proporciones relativas, lo que hace que cada queso tenga su sabor, aroma, aspecto, textura y consistencia característicos y diferentes a las demás variedades <sup>(36)</sup>.

En general la clasificación de los quesos se resume en la siguiente tabla:

Cuadro N° 2. Clasificación de quesos. (8)

<b>Tipo de Queso</b>	<b>Característica</b>	<b>Ejemplo de queso</b>
<b>BLANDOS</b>	Sin madurar, con poca grasa	Queso cremado
	Sin madurar, con mucha grasa	Queso crema
	Madurados	Camembert
<b>SEMI BLANDOS</b>	Madurados solo por bacterias	Munster
	Madurados por bacterias en la superficie	Limbueguer
	Madurados por moho azul en el interior	Roquefort
<b>DUROS</b>	Madurados por bacterias, sin ojos	Cheddar
	Madurados por bacterias, con ojos	Suizo
<b>MUY DUROS (para rayar)</b>	Madurados por bacterias	Parmesano
<b>QUESOS FUNDIDOS</b>	Pasteurizados, empaquetados en frío, o productos similares	Tipo americano
<b>QUESOS DE SUERO</b>		Ricotta

**QUESO DURO BLANDO:**

Es un queso maduro de pasta prensada y de consistencia dura de textura bastante cerrada; con algunos ojos pequeños de tipo mecánico y de sabor ligeramente salado. Es originario del oriente del país y su color es blanco marfil

(39).

**Método de Elaboración:** (35,39)

- Recepción: aquí se pesa o mide la leche, se filtra y luego se descrema parcialmente para estandarizar a un 2% la materia grasa
- Maduración: la leche se deja reposar por 3 horas hasta alcanzar una acidez del 0.18 a 0.20%
- Adición de lipasa 300: agregando 13 g para 100 Litros de leche.
- Adición del coagulante: este debe realizarse cuando la leche tenga 32<sup>o</sup>C, agregar 15 c.c. de cuajo por 100 litros de leche, agitar bien para obtener una coagulación uniforme y el tiempo es de 60 minutos.
- Corte de la cuajada: con la lira de cuerdas es parecida al de 1 cm.
- El agitado se hace lentamente por 10 minutos para facilitar el desuerado y evitar que los cubos se unan.
- Reposo: una vez que los cubos de cuajada del tamaño de una semilla de maíz, se deja reposar la cuajada durante 20 minutos aproximadamente para que sedimente.
- Prensado: se realiza el prensado hasta que la cuajada alcance cierta firmeza. La maduración de esta etapa dependerá del volumen de leche que se está prensando y del equipo empleado.
- Es el corte el bloqueo de la cuajada en el primero se corta en trozos que sean manejados en la palma de la mano y se colocan en la mesa de desuerado, el segundo corte se hace a la mitad del primero casi del tamaño de una caja de fósforos.
- Luego viene la salación que se hace 24 horas inmersas con una salmuera y esta debe tener 18% de sal.
- Moldeado y prensado: previamente al llenado de los moldes estos son recubiertos interiormente con tela quesera, con un colador se recoge la cuajada y se llenan los moldes, posteriormente se prensa por dos o tres días incrementando gradualmente la presión.

- Maduración: este se puede madurar o no de acuerdo a la demanda; se recomienda una maduración de 15 días a un mes de temperatura y humedad ambiente (26 – 30°C)

### **QUESO FRESCO:**

Pertenece a la categoría de quesos frescos sin maduración y sin prensado, con textura suave debido a su gran contenido de humedad y posee un alto contenido en grasa, la principal diferencia entre el queso cremado y el queso fresco es que en el primero se utiliza cuajo combinado con un cultivo que ayudará a proporcionarle sus características plásticas y suaves (29,35).

### **3.9 PROCESO PARA LA ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO:**

- Filtrar la leche para eliminar cualquier material extraño.
- Pasteurizar la leche a 65 °C por 30 minutos y enfriar a 32 °C.
- Coagular la leche utilizando coagulante líquido o en pastilla, agitar por 5 minutos y dejar en reposo durante 45 minutos a 1 hora.
- Corte de la cuajada, utilizar cuchillo o lira para cortar la cuajada en cubos, remover suavemente cada 5 minutos durante media hora.
- Eliminar el exceso de suero: retirar el exceso de suero dejando una mínima cantidad que permita mantener sueltos los granos de cuajada.
- Salado: adicionar sal directamente al queso en forma gradual, mezclar bien y dejar por una hora en salazón (2 libras de sal/100 botellas).
- Moldeo: Depositar la cuajada en los moldes y dejar escurrir por una hora.
- Refrigerar (35).

### **3.10 MECANISMO DE LA COAGULACIÓN ENZIMÁTICA DE QUESOS.**

La coagulación es la primera de las operaciones indispensables para transformar la leche en queso. Esto se consigue tratando la leche con cuajo de

terneros, cuajos vegetales, cuajos de origen microbianos, o con ácidos u otros compuestos químicos (42).

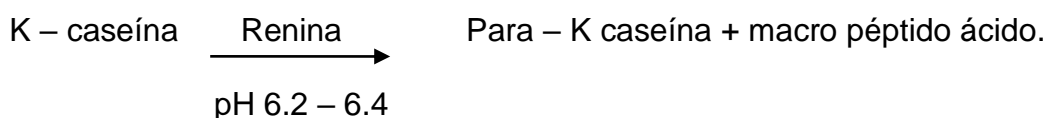
## BIOQUIMICA DE LA COAGULACION.

### 1° Etapa. Hidrólisis de la kappa-caseína:

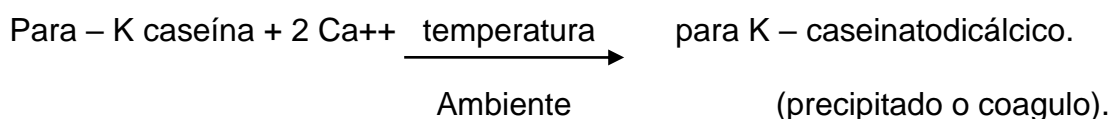
La acción primaria de la renina es el rompimiento de la molécula de kappa-caseína en dos residuos: la para kappa-caseína y un péptido complejo muy ácido. La renina, al hidrolizar la kappa-caseína que está en la superficie de las micelas, libera un componente muy ácido, reduciendo así el número de cargas negativas en la micela produciendo así, que las fuerzas atractivas sobrepasen a las repulsivas produciendo el proceso de coagulación. En esta etapa la leche no sufre ningún cambio físico detectable a simple vista y se da a temperaturas entre 0-5°C.

## COAGULACION POR ACCION DE LA RENINA.

### PRIMERA ETAPA.



### SEGUNDA ETAPA.

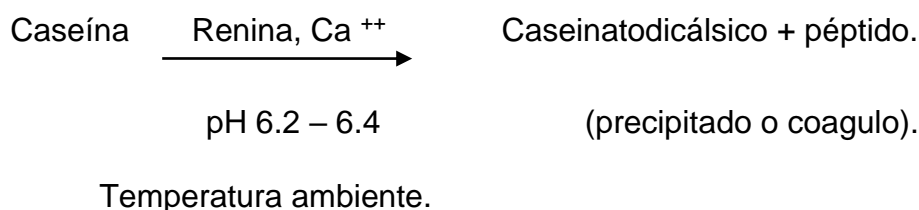


2ª Etapa: Precipitación de las micelas alteradas por la renina por la presencia de iones calcio:

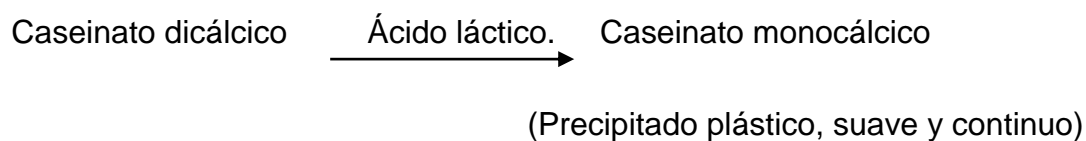
La renina en adición a ser un catalizador muy potente en la ruptura de la kappa-caseína, posee una habilidad de hidrolizar proteínas, por lo que las proteínas del queso sufren una proteólisis extendida durante la maduración, esta proteólisis de las diferentes fracciones de la caseína afectan el sabor del queso, un ejemplo es la beta-caseína que produce sabores amargos, pero es reducida su acción con sal al 5% e inhibida completamente con sal al 10%. Por otro lado el alfa-caseína no da sabores amargos y contribuyen de manera decisiva en el sabor del queso y es máxima con sal de 5 al 10%. La inhibición de la sal sobre la beta-caseína es independiente del pH y la temperatura (13, 26,42).

MECANISMO COMPLETO DE COAGULACIÓN DE LA LECHE (10, 13,26).

#### PRIMERA FASE: COAGULACIÓN



#### SEGUNDA FASE: MODIFICACIÓN ÁCIDA.



### **3.11 FABRICACION DE QUESOS.**

La formal clasificación del queso proporciona información muy útil. Para la mayoría de las 18 variedades de queso natural, existen ocho pasos básicos con variación de grados de énfasis en cada paso, que nos llevan a la producción de queso fresco deseado o a una cuajada básica lista para ser madurada (10, 36,40).

### **3.12 PROCESOS BÁSICOS EN LA FABRICACIÓN DE QUESOS.**

1. Preparación de la leche: Prepara la leche para acidez y formación de cuajada e incorporación en los cultivos microbianos adecuados.
2. Corte o rotura de la cuajada: Precipitar la expulsión del suero y ayudar al cocimiento de la cuajada aumentando el área de superficie.
3. Cocimiento de la cuajada: Contraer la cuajada para una extracción e suero más efectiva, desarrollar la textura y establecer el control de la humedad.
4. Escurrimiento o drenaje; Separar permanentemente el suero de la cuajada.
5. Entretejido de la cuajada: transformar la cuajada a la textura deseada, dar más tiempo al desarrollo de acidez y ayudar en el control de la humedad.
6. Salado: Influir en el sabor humedad y textura.
7. Prensado: Dar forma y cerrar el cuerpo del queso.
8. Aplicaciones especiales: Incorporar los microorganismos característicos a un tipo de queso específico y establecer el ambiente adecuado para su desarrollo (35,39).

### **3.13 MICROORGANISMOS PRESENTES EN LA LECHE DE VACA Y SUS DERIVADOS.**

La leche segregada por la mama, en condiciones normales, es estéril. Pero antes de abandonar la ubre es infectada por bacterias que entran a través del canal del pezón, siendo estas normalmente inofensivas y reducidas en

números. Por ser la leche un excelente medio nutritivo favorece la multiplicación de microorganismos desde el punto de vista físico. Además al ser un producto de origen animal, sujeto a una diversidad de métodos de producción, se puede contaminar con un amplio espectro de microorganismos que al no ser correctamente eliminados pueden ocasionar problemas durante la fabricación de un derivado o bien ocasionar enfermedades en el consumidor final (17, 19,20)

En general se puede resumir la importancia del estudio microbiológico de la leche basado en esos tres aspectos:

- Los microorganismos producen cambios deseables o indeseables en las características físicas químicas de la leche durante la elaboración de diversos productos lácteos.
- Los productos lácteos y la leche pueden contaminarse con microorganismos patógenos o sus toxinas y provocar enfermedad en el consumidor.
- Los microorganismos pueden causar alteraciones de la leche y productos lácteos haciéndolos inadecuados para el consumo humano.

Cuando la leche se enfría y se mantiene a temperaturas de 4°C se previene normalmente la multiplicación de las bacterias, al menos en las primeras 24 horas y la microbiota es por tanto, similar a la presente originalmente tras el ordeño (20).

Inicialmente, la microbiota predominante es de bacterias mesófilas aeróbicas y es difícil detectar más de un 10 – 20% de bacterias psicrótrofas. Sin embargo, la leche presenta una microbiota de este tipo de bacterias que es muy variada por lo que a medida se prolonga la refrigeración ésta se prolifera y se produce un predominio del género *Pseudomonas* en especial *P. fluorescens* representando un 90%. También se encuentran bacterias Gram (+), en especial



cocos, generalmente *Micrococcus* y *Streptococcus*, los cuales pueden llegar a ser más del 10% de la microbiota presente a 6°C. El género *Bacillus* no es muy habitual por debajo de 5°C, pero aumenta el 5% a partir de los 10°C (19,20).

Muchas bacterias pueden encontrarse de forma casual en la leche, siendo éste el caso del *Micobacterium tuberculosis*, que puede vivir o incluso reproducirse en ella, siendo causante de enfermedades respiratorias; y bacterias *Coliformes* como la *Escherichia coli* causantes de enfermedades diarreicas e indicadores de higiene de los procesos de producción (17, 19,20).

Bacterias formadoras de ácido butírico. Estas bacterias son del tipo anaerobios, forman esporas y tienen una temperatura óptima de crecimiento de 37°C, no desarrollan bien en leche que contenga oxígeno, pero si lo hacen en los quesos donde las condiciones anaerobias prevalecen sobre las demás. Estos procesos fermentativos dan lugar a grandes cantidades de anhídrido carbónico, hidrógeno y ácido butírico. El queso presenta defecto de hinchamiento, con una textura irregular y sabores extraños, se encuentran comúnmente en la naturaleza, en suelos, plantas, estiércol y en utensilios almacenados en condiciones defectuosas (20).

Bacterias formadoras de ácido propiónico. Su temperatura de crecimiento es de 30°C, hay gran variedad de especies y algunas sobreviven a la pasteurización “el método de alta temperatura y alta presión” (HTST). La inocuidad de algunos cultivos puros utilizados con ciertos lactobacilos y lactococos son útiles en la fabricación de quesos como: Emmental, Gruyere y Maasdam, en los que son responsables en la formación de ojos y contribuyen en su característico sabor (17, 19,20).

Bacterias de la putrefacción. Algunas de estas bacterias son psicótropas, pero hay un gran número de especies tanto bacilos como cocos que son capaces de crecer aerobia o anaerobiamente. Estas bacterias se encuentran en suelos y

aguas contaminadas, produciendo lipasas y proteasas muy resistentes al calor. Los productos de proteólisis pueden aportar un aroma desagradable al degradarse hasta amoníaco que es muy volátil, algunas de estas bacterias incluso producen un tipo de enzimas similar a la renina, que puede coagular la leche sin acidificarla (coagulación dulce). Un ejemplo típico de estos microorganismos es el *Clostridium sporogenes*, un productor de gas que bajo condiciones anaerobias produce en quesos procesados fermentaciones con malos olores (17, 19)

Cuadro N° 3. Tipos de microorganismos presentes en la leche que ocasiona Problemas en la elaboración de quesos (17, 19,20).

TIPOS BIOQUÍMICOS	MICROORGANISMOS REPRESENTATIVOS	FUENTES	ACCIÓN E IMPORTANCIA
Productores de ácido	<i>Streptococos</i> y <i>Lactobacilos</i>	Utensilios, pastura, estiércol	Fermentan la lactosa a ácido láctico y/o ácido acético y CO <sub>2</sub> evitan la coagulación óptima del queso
	<i>Coliformes:</i> <i>Escherichia coli</i> (origen fecal), <i>Enterobacter</i> (origen fecal y otras fuentes)	Estiércol, agua contaminada, suelo y plantas.	Fermentan la lactosa a ácidos y gases. Grupo indicador de la calidad sanitaria y degrada el producto derivado final, productor de enfermedades diarreicas
Productores de gas	<i>Coliformes</i> y <i>Clostridium sp.</i>	Estiércol, agua contaminada, suelo y plantas	Fermentan la lactosa con producción de gas, ocasionando irregularidades de olor y sabor en el queso.

Cuadro N° 3. (continuación)

TIPOS BIOQUÍMICOS	MICROORGANISMOS REPRESENTATIVOS	FUENTES	ACCIÓN E IMPORTANCIA
<b>Proteolíticos.</b>	<i>Bacillu ssp.</i> , <i>Pseudomona ssp.</i>	Tierra, agua y utensilios.	Degradan proteínas, produciendo olor y sabores anormales, coagulan la caseína arruinando el queso.
<b>Lipolíticos</b>	<i>Pseudomona ssp.</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Estafilococcus</i> , otros, y hongos.	Tierra, agua y utensilios.	Produciendo malos olores y sabor agrio, hidrolizan grasas produciendo defectos de consistencia en quesos.

**Otro microorganismo encontrado en los productos lácteos es:**

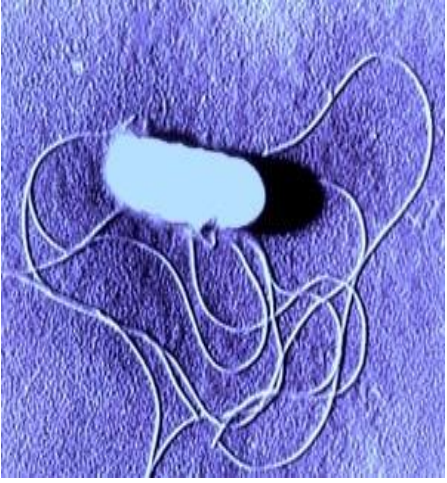
<p>Clasificación científica</p> <p>Dominio: Bacteria</p> <p>Filo: Firmicutes</p> <p>Clase: Bacilli</p> <p>Orden: Bacillales</p> <p>Familia: <i>Listeriaceae</i></p> <p>Género: <i>Listeria</i></p> <p>Especie: <i>L. monocytogenes</i></p> <p>Nombre binomial: <i>Listeria monocytogenes</i></p>	
--	--

Figura: N° 1 *Listeria monocytogenes*

Es una bacteria que se desarrolla intracelularmente y es causante de la Listeriosis. Es uno de los patógenos causante de infecciones alimentarias más virulentos, con una tasa de mortalidad entre un 20 a 30%, más alta que casi todas las restantes toxicoinfecciones alimentarias. *L. monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, pequeño (0,4 a 0,5 micrones de ancho x 0,5 a 1,2 de largo) no ramificado y anaerobio facultativo capaz de proliferar en un amplio rango de temperaturas (1 °C a 45 °C) y una elevada concentración de sal. Es catalasa positiva y no presenta cápsula ni espora. Tiene flagelos peritricos, gracias a los cuales presenta movilidad a 30 °C o menos, pero es inmóvil a 37 °C, temperatura a la cual sus flagelos se inactivan (5, 11).

Normalmente, este microorganismo prolifera a números potencialmente peligrosos dentro de 1 a 35 días. El período de incubación ha sido conocido y tiene un amplio rango como 1 a 91 días, sin embargo, bajo las condiciones ideales se ha informado que toman un tiempo pequeño como 1.75 a 2 horas.

Las infecciones serias pueden producir septicemia (envenenamiento de la sangre), meningitis, encefalitis, infección del sistema nervioso central, y posiblemente la muerte. Estos síntomas pueden precederse por síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos y diarreas, fiebre o dolor de cabeza (5, 11,14).

### **3.14 *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* recibe su nombre del cirujano inglés Joseph Lister (Listeria) y de su capacidad de que extractos de su membrana son capaces de

estimular la producción —generar— monocitos (monocytogenes) en el conejo, aunque no en la enfermedad del ser humano (11)

### 3.14.1 Características

El género se encuentra definido por poseer un contenido de DNA G+C, aproximadamente de un 38% además en su membrana celular tiene una pared celular de mureina, péptidoglucano que contiene ácido meso-diaminopimélico que se encuentra fijo a la membrana celular por el ácido teicoico y el ácido lipoteicoico presentes en la membrana celular. Puede ser aislada de diversos ambientes como suelo, agua fresca, aguas residuales y vegetación y puede llegar a infectar numerosos animales domésticos contaminando la vegetación y el suelo donde habitan. Es también un contaminante frecuente de los productos alimentarios, ya que es capaz de generar biopelículas en alimentos que se encuentren en refrigeración, porque tiene la capacidad de crecer hasta a 4 °C.

La infección por *L. monocytogenes*, en el contexto del embarazo, suele diagnosticarse de forma tardía, produciéndose un cuadro muy grave, llamado granulomatosisinfantisepticum, llegando a provocar abortos. También se ha relacionado con Meningoencefalitis y meningitis especialmente en neonatos, ancianos e inmunodeprimidos, así como bacteriemia en mujeres gestantes, inmunodeprimidos y neonatos (granulomatosisinfanto-séptica) (11).

*L. monocytogenes* es un patógeno facultativo intracelular que puede crecer en los macrófagos, las células epiteliales y los fibroblastos en cultivo. Tras la ingesta de alimentos contaminados, *L. monocytogenes* puede sobrevivir a la exposición a enzimas proteolíticas, ácido gástrico y sales biliares. Principalmente contiene una proteína denominada internalina la cual interactúa con el receptor de las células del hospedero para la adhesión celular, esta se

denomina E-cadherina la cual induce la fagocitosis, siendo estas específicas para cada tejido. La presencia de internalinas facilita la entrada del microorganismo a las células. El organismo reacciona creando una especie de fagosoma con el fin de encapsular la bacteria pero esta produce listeriolisina O y fosfolipasas C que le permiten destruir el fagosoma hidrolizando los lípidos de su membrana. Esta listeriolisina esta codificada por el gen *hly*. Al estar dentro del citosol *L. monocytogenes* utiliza una proteína de superficie denominada ActA la cual genera la polimerización intracelular de la actina.

Estos filamentos se reorganizan en una larga cola que se extiende desde un solo extremo de la bacteria. Mediante los movimientos de la cola el microorganismo migra por el citoplasma hacia la membrana de la célula huésped. En la periferia se forman protrusiones (filópodos) que pueden penetrar en las células adyacentes y que permiten el ingreso de la bacteria. Esto explica la necesidad de una inmunidad mediada por células. Puesto que los microorganismos nunca son extracelulares, los anticuerpos humorales del huésped no serían efectivos.

### **3.14.2 Tratamiento**

Al ser la Listeriosis una enfermedad relativamente rara en humanos, no hay estudios prospectivos y controlados que establezcan el mejor tratamiento antibiótico. Dado que la mayoría de los antibióticos son bacteriostáticos para *L. monocytogenes*, actualmente se considera que las mejores opciones son las combinaciones de gentamicina con penicilinas de espectro ampliado como la ampicilina.

Se han descrito fallos terapéuticos con estos antibióticos, pero nunca se ha demostrado in vitro resistencia al compuesto  $\beta$ -lactámico utilizado. En el manejo de estas infecciones son de gran importancia el empleo de dosis altas y la

duración adecuada del tratamiento, que deben individualizarse. En las enfermedades graves como la cerebritis o la granulomatosisinfantiséptica, el inicio precoz del tratamiento es fundamental para el control de la infección. Estudios in vitro han demostrado sinergia de ampicilina y penicilina con aminoglucósidos. Esta asociación debe utilizarse en casos de granulomatosisinfantiséptica o de sepsis neonatal. En aquellos pacientes con meningoencefalitis pueden asociarse aminoglucósidos, administrados por vía intratecal, al tratamiento base de penicilina o ampicilina.

La combinación de trimetoprim y sulfametoxazol se ha utilizado con éxito en pacientes alérgicos a penicilinas, considerándose en la actualidad la terapia alternativa en esta circunstancia.

La duración apropiada del tratamiento tampoco está clara. Tras dos semanas de terapia se han descrito recurrencias en pacientes inmune deprimidos. Parece conveniente, por tanto, prolongar la terapia entre tres y seis meses en estos casos. En general dos semanas parecen ser suficientes en bacteriemias mientras que en meningitis se deberían utilizar ciclos más largos <sup>(11)</sup>

### **3.14.3 Resistencia antibiótica**

*Listeria* es resistente a las penicilinas naturales (penicilina G, penicilina V), penicilinas resistentes a  $\beta$ -lactamasa (meticilina, nafcilina, isoxazoilpenicilina—oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina—) y a todas las cefalosporinas. Pero es susceptible a las penicilinas de espectro ampliado <sup>(11)</sup>

### **3.14.4 Alternativas**

Otras alternativas son cotrimoxazol, eritromicina, cloranfenicol, rifampicina, tetraciclinas, carbapenémicos, entre otros.

### 3.14.5 Profilaxis

Es necesario un control exhaustivo en todas las fases:

- a) En las empresas lácteas se debe implantar un programa de autocontrol de los procesos según el Sistema APPCC.
- b) En la granja hay que controlar el ensilado para que acidifique cuanto antes, porque en el medio ácido la bacteria se desarrolla muy mal.
- c) Almacenar la leche a menos de 4 °C, para evitar el desarrollo microbiano
- d) El trabajador que tenga síntomas de padecer la enfermedad debe abstenerse de manipular alimentos.
- e) La bacteria crece con relativa facilidad a temperaturas bajas, por ello es importante que los equipos de refrigeración funcionen dentro de unos rangos de temperatura menores de 4 °C.

El patógeno tiene como característica su capacidad para desarrollarse a temperaturas de refrigeración, en presencia de altas concentraciones de cloruro de sodio. Presenta además, mayor resistencia térmica en comparación a otras bacterias patógenas no esporuladas. Su resistencia a altas temperaturas, llevó a considerar la necesidad de aumentar los estándares de pasteurización de la leche. Sin embargo, numerosos estudios posteriores demostraron que la pasteurización a 72 °C durante 15 o más segundos, son suficientes para destruir el bajo número de células de *L. monocytogenes* habitualmente presentes en leche cruda. El aislamiento de la bacteria en productos lácteos pasteurizados obedecería por lo tanto a un proceso deficiente o a una recontaminación post tratamiento térmico <sup>(11)</sup>

Entre los factores que contribuyen a la resistencia térmica de *L. monocytogenes* están, un sistema de proteínas que se activa frente al shock térmico, al ser expuesta la bacteria a temperaturas subletales previo al tratamiento térmico. Este aspecto debería tenerse en cuenta al utilizar la termización como



mecanismo para destruir bacterias saprófitas, previo a la pasteurización. Se ha encontrado también que *L. monocytogenes* presenta mayor resistencia a las altas temperaturas, mientras mayor sea su permanencia en la leche cruda bajo condiciones de refrigeración. Otro factor importante es el contenido graso del alimento, observándose mayor resistencia térmica al encontrarse el patógeno en crema y leche entera (11,14)

### 3.14.6 Identificación microbiológica

Se desarrolla muy bien en agar sangre generando colonias grisáceas y presentando beta hemolisis. Es un bacilo catalasa positivo, móvil y se evidencia en medios de cultivo semisólido donde a los 25 °C el microorganismo forma una especie de sombrilla. Se desarrolla de manera adecuada en bilis, por lo que se utilizan medios inclinados con agar bilis esculina. Esta prueba consiste en determinar la capacidad que tiene *L. monocytogenes* de hidrolizar la esculina a esculetina y la glucosa en presencia de sales biliares. La esculetina generada reacciona con los iones de hierro que contiene el cloruro férrico en el medio y genera una coloración negra, siendo esta positiva (11,14).

*L. monocytogenes* presenta un metabolismo fermentativo al generar ácido a partir de la glucosa y por producir acetona, lo que conlleva a una reacción de Voges-Proskauer positiva y no fermenta la xilosa. La fermentación de estos azúcares se evidencian por la técnica de voges-proskauer, la cual consiste en identificar si *L. monocytogenes* genera ácidos y diacetilo ya que el medio contiene azúcares fermentables. Para ver la reacción se utilizan los reveladores alfa-naftol y KOH. Si la suspensión se torna color rosa la prueba es positiva.

La prueba de CAMP es utilizada para la identificación de *L. monocytogenes* Consiste en sembrar en agar sangre una estría en forma horizontal de *L. monocytogenes* y una perpendicular a esta de *S.aureus* sin unirse entre sí. El

resultado esperado será que *L. monocytogenes* genere el factor CAMP el cual produce un sinergismo con la beta lisina producida por *Staphylococcus aureus* sobre los eritrocitos generando una lisis de estos (11, 14).

## **CAPITULO IV**

### **DISEÑO METODOLOGICO.**

## 4.0 DISEÑO METODOLOGICO

### 4.1 Tipo de estudio

El tipo de estudio realizado fue prospectivo, trasversal y experimental:

**Prospectivo:** ya que se registró la presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes*, en los quesos frescos y duros blandos que actualmente se comercializan en los principales mercados: La Tiendona, Central y San Miguelito.

**Transversal:** la investigación se realizó en un tiempo determinado, para efectuar un estudio de interés en el presente, es decir en el momento que se realizó la investigación.

**Experimental:** debido a que se clasificó como un estudio de laboratorio, ya que las muestras que se recolectaron se transportaron al laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador para su análisis.

### 4.2 Investigación bibliográfica

Se realizó a través de visitas y consultas a las siguientes instituciones:

- Administración Municipal de Mercados Unidad de Cuentas Corrientes.
- Biblioteca de la Universidad Alberto Másferrer (USAM)
- Biblioteca de la Universidad Dr. José Matías Delgado
- Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de la Universidad Nueva San Salvador (UNSSA)
- Oficina de Información y Respuesta, Ministerio de Salud (MINSAL).
- Internet.

### 4.3 INVESTIGACION DE CAMPO

**Guía de Observación:** la cual se elaboró con el objetivo de seleccionar las dos variedades de quesos a analizar, se visitó y observó en los diferentes puestos de los mercados la Tiendona, Central y San Miguelito, condiciones higiénicas, manipulación de utensilios y otros. (anexo N°1)

**Universo:** muestras de quesos frescos y duros blandos que son comercializados en los 35 puestos de la Tiendona, 212 puestos del Central y 46 puestos del San Miguelito. (anexo N° 3)

**Muestra:** Queso fresco y duro blando seleccionados, obtenidos de los diferentes puestos de los mercados.

**Toma de muestra** (6,27): para la recolección de las muestras se llevó a cabo el muestreo aleatorio estratificado, con el propósito que todas las muestras tuvieran la misma probabilidad de ser seleccionadas, para poder determinar cuántas muestras de cada queso pudieran ser tomadas para el análisis; se consideró un 50% de probabilidad que las muestras estén contaminadas, con una confianza del 95% (valor estándar del 1.96) y un intervalo de error del 0.5 (valor estándar), se utilizó la siguiente ecuación:

$$n = \frac{NZ^2pq}{d^2(N-1) + Z^2pq}$$

Dónde:

n = número total de muestras a tomar.

N= población total

Z= valor de confianza (95% ≈ 1.96)

d= intervalo de error (0.5)

P= la probabilidad de éxito que será del 50%.

q= la probabilidad de fracaso que será del 50%.

$$n = \frac{(293)(1.96)^2(0.5)(0.5)}{(0.5)^2(293 - 1)^2 + (1.96)^2(0.5)(0.5)}$$

n = 4.0 (tamaño de la muestra).

El porcentaje representativo de cada estrato se representa así:

$$\% = \frac{N_i}{N} \times 100$$

Dónde: Ni= Número de puestos por estratos.

N= Número de puestos en el universo.

Así tenemos para el estrato:

$$\% = \frac{212}{293} \times 100$$

= 72.4 ≈ 72.0% Mercado Central

Cuadro N° 4 Porcentaje de cada estrato.

<b>Mercados</b>	<b>Cálculo</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>La Tiendona</b>	(35 / 293) X 100	12.0
<b>Central</b>	(212 / 293) X 100	72.0
<b>San Miguelito</b>	(46 / 293) X 100	16.0
	<b>TOTAL</b>	100.0

La unidad muestreada de cada estrato se obtuvo de la siguiente manera:

$$n_i = \frac{N_i}{N} \times N$$

Dónde:

$n_i$  = número de puestos a muestrear por cada estrato.

$n$  = tamaño de muestra

$N_i$  = número de puestos por estrato.

$N$  = número de puestos en el universo.

Así, para el estrato 1 tenemos:

$$n_i = \frac{212}{293} \times 4 = 2.9 \approx 3.0 \text{ puestos}$$

Cuadro N° 5 Calculo de puestos a muestrear.

mercados	Cálculo	$n_i$ (puestos)
La Tiendona	$4(35 / 293)$	1.0
Central	$4(212 / 293)$	3.0
San Miguelito	$4(46 / 293)$	1.0
	<b>TOTAL</b>	5.0

#### 4.4 Determinación y selección de los quesos a muestrear <sup>(6)</sup>.

Se seleccionaron dos variedades de quesos: 5 quesos frescos y 5 quesos duros blandos los cuales son los más consumidos por la población Salvadoreña.

Por cada puesto se toma una muestra de queso fresco y una de queso duro blando reflejado en el siguiente cuadro:

Cuadro Nº 6 Número de puestos a muestrear.

Mercado	Queso fresco			Queso duro		
	Puesto 1	Puesto 2	Puesto 3	Puesto 1	Puesto 2	Puesto 3
Tiendona	1			1		
Central	1	1	1	1	1	1
San Miguelito	1			1		

Teniendo un total de 10 muestras, 5 muestras de queso fresco y 5 muestras de queso duro blando.

Los puestos se tomaron aleatoriamente de cada mercado.

Para que el muestreo fuera representativo se tomó un total de 60 muestras, tomando por cada muestreo 20 (10 muestras de queso fresco y 10 duro blando) de los diferentes puestos de los mercados.

Los análisis se realizaron durante los meses de julio hasta diciembre en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.



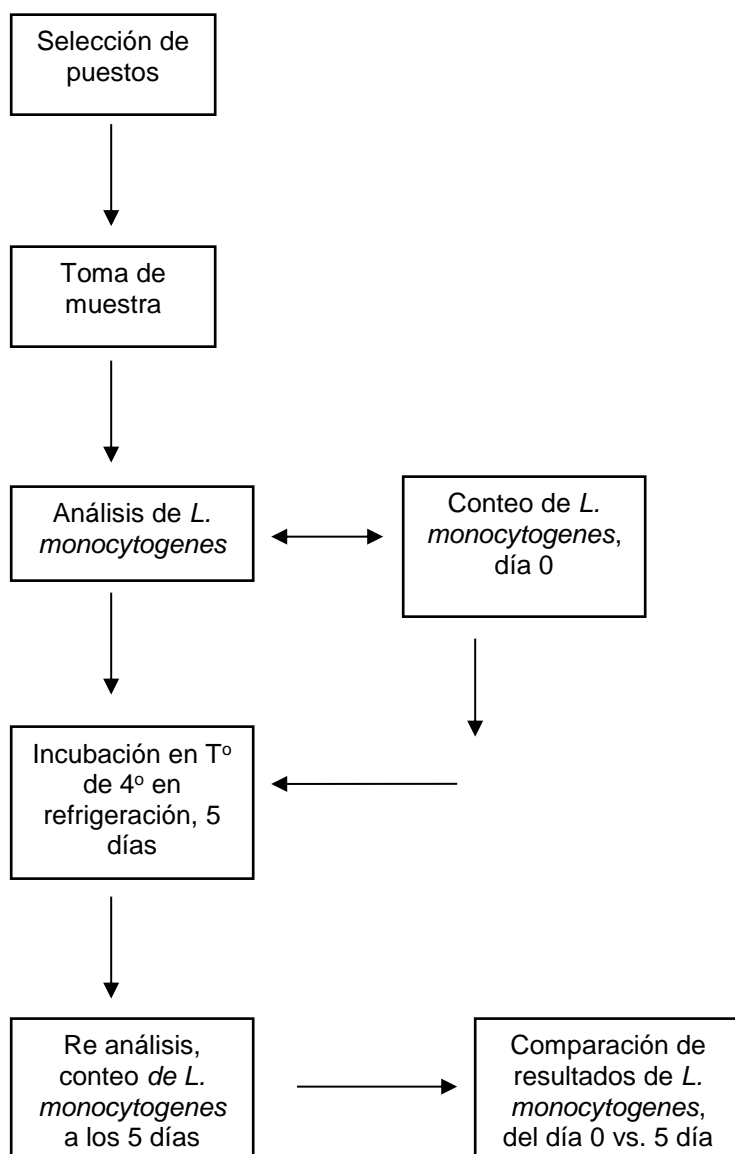


Figura N°2 Diagrama de flujo para la investigación

## 4.5 PARTE EXPERIMENTAL:

### 4.5.1 Tratamiento de muestras de quesos fresco y duro blando:

Enriquecimiento. <sup>(5)</sup>

1. En un erlenmeyer pesar 25g de la muestra en forma aséptica en una balanza semianalítica, asegurar que se represente tanto la superficie como el interior de la muestra.
2. Agregar 225mL de caldo de enriquecimiento de Listeria (LEB), colocar en el stomacher por 3 minutos a 260 rpm.
3. Incubar a 35°C por 24 horas (anexo N° 4).

### 4.5.2 Aislamiento de *L. monocytogenes*.<sup>(5)</sup>

1. Tomar una asada del medio de cultivo de enriquecimiento (LEB) y estriar en medio de cultivo Oxford (OXA) y PALCAM por duplicado.
2. Incubar las placas de agar OXFORD y PALCAM por 24 - 48 horas a 35°C, luego refrigerar a 4°C por 24 – 48 horas o más para su óptimo crecimiento y caracterización de las colonias (ver anexo 4).
3. Verificar características de colonias típicas de *L. monocytogenes*, los cuales son de color verde grisáceo con un halo marrón-negro.
4. Transferir 5 colonias típicas del agar OXFORD a placas de agar tripticasa soya +0.6% de extracto de levadura (TSAye).
5. Incubar las placas de (TSAye) con las colonias típicas de *L. monocytogenes* a 35°C (anexo N° 4).

Cuadro N° 7 Características típicas de colonias de *Listeria monocytogenes*.

Medio de Cultivo	Características típicas de colonias
OXFORD	Colonias de color verde grisáceo con un halo marrón-negro. Si las colonias crecen muy próximas, la totalidad del medio de cultivo adopta una coloración marrón-negro.
PALCAM	Colonias de color verde grisáceo con un halo marrón-negro, se crecen las colonias próximas, el medio de cultivo adopta una coloración marrón-negro.
TSAye	Colonias redondas de color blanco- hueso.

#### 4.5.3 Identificación de *L. monocytogenes*.

Las pruebas de identificación a realizar serán las siguientes:

- Catalasa (5).

1. Seleccionar una colonia típica de (TSAye), con un palillo estéril, colocar la colonia típica en un porta objeto.
2. Agregar una gota de peróxido de hidrogeno al 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al porta objeto con la colonia típica. Un burbujeo en los primeros segundos indica reacción positiva (anexo N° 4).



- Tinción al gram (5).

1. Colocar sobre un porta objeto estéril una gota de solución salina.

2. Tomar una colonia típica de *L. monocytogenes* con un asa bacteriológica y colocarla sobre la gota de solución salina y expandirla sin tocar la superficie del portaobjeto (frotis).
3. Tomar el frotis y colocarlo sobre la base del mechero de bunsen, hasta que seque el frotis.
4. Luego agregar 1 o 2 gotas de cristal violeta, dejarlo aproximadamente por un minuto.
5. Tomarlo y lavarlo con agua desmineralizada, agregar lugol y dejarlo por un minuto.
6. Lavarlo con agua desmineralizada y agregar unas gotas de alcohol cetona.
7. Agregar Safranina cubriendo la muestra y dejarlo por un minuto.
8. Lavar con agua desmineralizada y poner a secar en la base del mechero de bunsen.
9. Seco, observar al microscopio, la *L. monocytogenes* es un bacilo gram positivo no ramificado (ver anexo N° 4 y 5).

- Hemólisis (5).

1. Dibujar de 20 a 25 espacios en la base de la placa de agar sangre.
2. Inocular con un asa en punta colonias típicas de *L. monocytogenes*, de las placas (TSAye) en las pacas de agar sangre. Pasar una colonia por espacio dibujado en la placa.

3. Incubar por 24 - 48 hrs las placas de agar sangre con las colonias típicas, observar la formación de un halo claro alrededor de las colonias típicas de *L. monocytogenes* (anexo N° 4).

- Prueba de CAMP <sup>(5)</sup>.

1. En placas que contienen agar sangre, estriar un cultivo de *Staphylococcus aureus*,  $\beta$ -hemolíticos y otro de *Rhodococcus equi*, en paralelo y diametralmente opuesto el uno del otro.
2. Luego estriar el inóculo de la muestra en forma paralela uno del otro pero en ángulo recto entre las estrías del *Staphylococcus aureus* y *Rhodococcus equi*.
3. Incubar las placas de agar sangre con los inóculos estriados a 35<sup>0</sup> C, por 24 – 48 hrs.
4. Examinar las placas de agar sangre incubadas y observar la formación de flecha de *L. monocytogenes* al interaccionar con *Staphylococcus aureus* (anexo N° 4).

- Motilidad <sup>(5)</sup>:

1. De las placas (TSAye) con *L. monocytogenes*, con un asa en punta tomar una colonia e inocular en un tubo que contenga medio de motilidad.
2. Incubar los tubos de motilidad con la *L. monocytogenes*, por 7 días a temperatura ambiente.
3. Observar crecimiento con forma de sombrilla de la *L. monocytogenes* (anexo N° 4)

-TSI <sup>(5)</sup>.

1. De las placas de (TSAye) con *L. monocytogenes*, con un asa en punta tomar una colonia típica.
2. Inocular la colonia de *L. monocytogenes* en el tubo que contiene medio TSI.
3. Incubar el tubo del medio TSI con la colonia típica de 1- 2 días a 35° C.
4. Observar cambio de color naranja-rojo del medio TSI, lo cual indica prueba positiva para *L. monocytogenes* (anexo N° 4)

- Reacción de Voges – Proskauer <sup>(5)</sup>.

1. Realizar una suspensión del microorganismo de *L.monocytogenes*, utilizando un asa, en un tubo que contiene 0.5 mL, del medio Voges- Proskauer.
2. Incubar el tubo del medio de Voges- Proskauer con *L. monocytogenes* a 35 ° C por 24 hrs.
3. Al tubo del medio Voges- Proskauer, agregar 10 gotas de la solución  $\alpha$ -naftol.
4. Agregar al tubo del medio de Voges- Proskauer con *L. monocytognes* 5 gotas de la solución de hidróxido de potasio, luego agitar durante 1 mn.
5. Una coloración rojiza (que puede aparecer con extrema lentitud) indica un resultado positivo para *L. monocytogenes* (anexo N° 4).

- Reacción de indol (5).

1. Inocular en un tubo que contiene 1mL de medio de triptona- peptona con el inóculo de *L. monocytogenes*, tomado del medio (TSAye) con colonias típicas.
2. Incubar los tubos del medio triptona-peptona con el inóculo de *L. monocytogenes* a 35<sup>0</sup> C por 24 hrs.
3. Agregar 2 gotas del reactivo Kovac a cada tubo del medio triptona-peptona con el inóculo de *L. monocytogenes*.
4. La aparición de un anillo rojo-violáceo indica una prueba positiva para *L. monocytogenes* (anexo N° 4).

- Prueba del rojo de metilo (5).

1. Inocular en un tubo que contiene medio de rojo de metilo, una colonia típica de *L. monocytogenes* tomada del medio (TSAye).
2. Incubar los tubos del medio de rojo de metilo con el microorganismo a 35<sup>0</sup> C por 24 hrs.
3. Agregar de 4 a 5 gotas al tubo del medio de rojo de metilo con el microorganismo el indicador de rojo de metilo.
4. La aparición de una coloración roja del medio rojo de metilo con el microorganismo indica un resultado positivo para *L. monocytogenes* y una coloración amarilla demuestra un resultado negativo (anexo N° 4)

- Fermentación de carbohidratos <sup>(5)</sup>.

1. Tomar colonias típicas de *L. monocytogenes* del medio (TSAye) e inocular en un caldo de tripticasa soja + extracto de levadura (TSBye).
2. Incubar los tubos de (TSBye) con el microorganismo a 37<sup>0</sup> C por 24 hrs.
3. Preparar una solución de ramnosa al 0.5% y colocar 2 mL a cada tubo.
4. A los tubos de ramnosa al 0.5%, inocular *L. monocytogenes* de los tubos del medio (TSABye).
5. Incubar los tubos de la solución de ramnosa al 5% con el microorganismo a 35<sup>0</sup> C por 7 días.
6. Un cambio de color en los tubos de ramnosa + microorganismo de violeta a color amarillo denota un resultado positivo de *L. monocytogenes* (anexo N<sup>o</sup> 4)

Cuadro N<sup>o</sup> 8 Resultados esperados de *L. monocytogenes*.

PRUEBAS	RESULTADOS ESPERADOS
Catalasa	Burbujeo en los primeros segundos.
Tinción al gram	Bacilo gram-positivo, pequeño, no ramificado
Hemolisis	Formación de un halo claro alrededor de la colonia típica de <i>L. monocytogenes</i> .
CAMP	Formación de flecha de <i>L. monocytogenes</i> , al interaccionar con <i>Staphylococcus aureus</i> .
Motilidad	Crecimiento con forma de sombrilla.
TSI	Cambio de color naranja-rojo del medio TSI.
Voger-Proskauer	Coloración rojiza (que puede aparecer con extrema lentitud)
Indol	La aparición de un anillo rojo-violáceo.



Cuadro N° 8 (continuación)

Rojo de Metilo	Aparición de una coloración roja en el medio es prueba positiva de <i>L. monocytogenes</i>
Fermentación de Carbohidratos	Cambio de color en los tubos de ramnosa con <i>L. monocytogenes</i> , de violeta a color amarillo es positiva

#### 4.6 EVALUACION DE SOBREVIVENCIA DE *Listeria monocytogenes* (12,25).

Para este tipo de investigación sobre la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco y duro blando se analizó de la siguiente manera:

A las muestras que resultaron positivas después de haberles realizado todas las pruebas de identificación se sometieron a un conteo en placa el cual consistió de esta manera:

1. El día 1 se realizó el primer muestreo.
2. El procedimiento realizado para las muestras fue (12,25)
  - En un Erlenmeyer de 250 mL se pesó 25g de la muestra, en forma aséptica en una balanza semianalítica, se aseguró que se represente tanto la superficie como el interior de la muestra.
  - Se agregó 225 mL de caldo de enriquecimiento de Listeria (LEB) y se colocaron en el stomacher por 3 mn a 260 rpm.
  - Se incubaron a 35°C por 1 hora.
  - Se tomaron 0.1 mL del medio de cultivo de enriquecimiento LEB y se estrió en medio de cultivo OXFORD.

- Se incubaron las placas de agar OXFORD por 24 hrs a 35<sup>0</sup>C, luego se refrigeraron a 4<sup>0</sup>C por 24 hrs para su óptimo crecimiento y caracterización de las colonias de *L. monocytogenes*.
  - Se verificaron características de colonias típicas de *L. monocytogenes*, las cuales son de color verde grisáceo con un halo marrón – negro y se realizó el conteo en placa (cuenta colonias) el día 1.
  - Se transfirieron 5 colonias típicas de *L. monocytogenes* del agar OXFORD a placas de agar tripticasa soya + 0.6% de extracto de levadura (TSAye).
  - Se incubaron las placas de TSAye con las colonias típicas de *L. monocytogenes* a 35<sup>0</sup>C por 24 horas.
  - Luego se sometieron las colonias típicas de *L. monocytogenes* de las placas de TSAye a pruebas de identificación como las del literal 2.5.3, para saber si las 5 colonias tomadas eran *L. monocytogenes*.
3. Después del primer muestreo del día 1, las muestras de los quesos se colocaron en refrigeración a una temperatura de 4<sup>0</sup>C (temperatura estándar de la refrigeradora en la cual estuvieron los quesos), por espacio de 5 días.
  4. A los 5 días se realizó el procedimiento del literal 2 y se realizó el conteo en placa en el medio de OXFORD.
  5. Al obtener los resultados del literal 2 y 4, se hizo una comparación del conteo en placa para poder observar la proliferación de la bacteria.
  6. Se evaluaron las características físicas y organolépticas de los quesos, del día 1 y a los 5 días, como: color, olor, textura para ver los cambios que estos presentaron <sup>(9)</sup>.

Cuadro N° 9 Características físicas y Organolépticas de los quesos.

Muestras Características	Queso fresco		Queso Duro Blando	
	Día 1	Día 5	Día 1	Día 5
<b>Color</b>	blanco	Blanco amarillento	Blanco - amarillo	Amarillo tenue
<b>Olor</b>	Característico a lácteo	Característico a fermento	Característico a lácteo	Característico a lácteo viejo
<b>Textura</b>	Masa semisólida	Masa semisólido y viscosa	semiduro	Dura y reseca

**Nota:** La metodología utilizada del conteo en placa se tomó del Manual de Procedimiento Enumeración *Listeria monocytogenes* en Alimentos ISO 11290-2. Modificado y Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species (anexo N° 10)

**CAPITULO V**  
**RESULTADOS DE ANALISIS.**

## 5.0 RESULTADOS DE ANALISIS.

### 5.1 Guía de observación.

Se realizó una guía de observación (anexo N° 1) para obtener datos iniciales sobre cuáles son los quesos más vendidos y algunas condiciones higiénicas de los puestos de los mercados: La Tiendona, Central y San Miguelito.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Cuadro N° 10. Tipos de quesos en los mercados existentes.

TIPOS DE QUESOS	MERCADOS					
	Tiendona Total de puestos= 35		Central Total de puestos= 150		San Miguelito Total de puestos= 46	
	# puesto	%	# puesto	%	# puesto	%
Queso duro blando	35	<b>100.0</b>	150	<b>70.75</b>	46	<b>100.0</b>
Queso duro viejo	25	71.43	105	49.52	33	71.74
Queso de capita	18	51.43	97	45.75	25	54.35
Queso fresco	31	<b>88.57</b>	120	<b>56.6</b>	39	<b>84.78</b>
Queso cremado	25	71.43	88	41.51	18	39.13
Queso majado	17	48.57	67	31.60	15	32.61
Quesillo	27	77.14	98	46.22	27	58.63
otros	20	57.14	65	30.66	13	28.26

Estos porcentajes son basados en el número total de la guía de observación; reflejando los diferentes tipos de quesos que se comercializan en los puestos de los mercados.

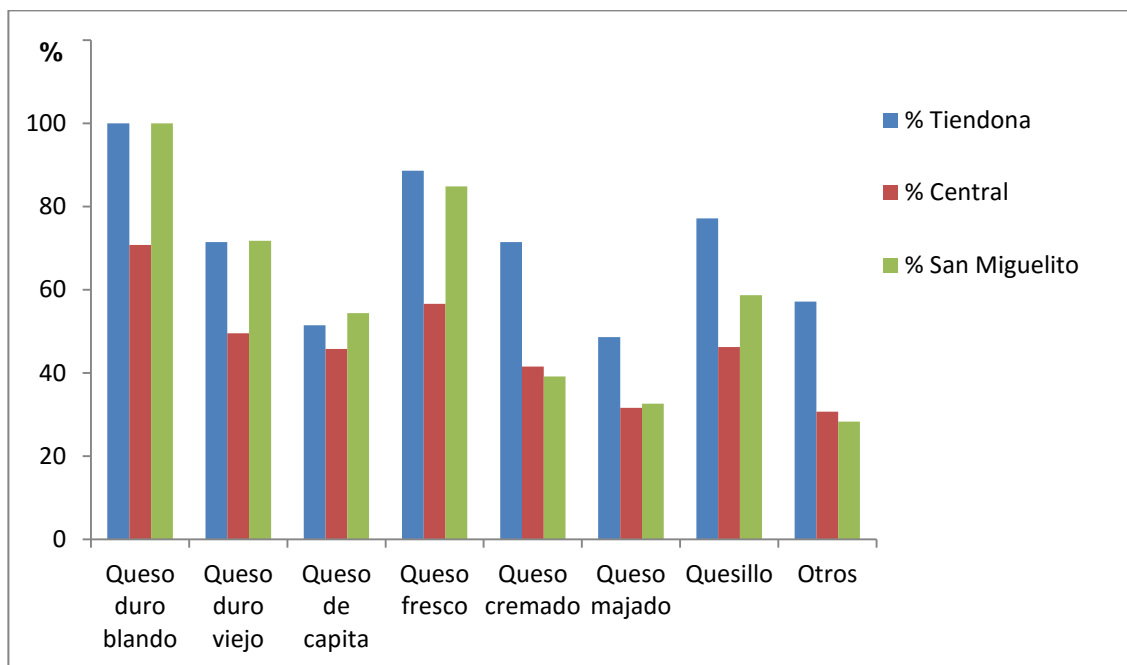


Figura N° 3 Dato de los quesos que poseen los puestos de los diferentes mercados.

Se refleja cuáles son los dos quesos que se encuentran en todos los puestos de venta de los tres mercados, siendo los quesos frescos y duros blandos.

Cuadro N° 11 Quesos más comercializados y preferidos por los consumidores.

TIPOS DE QUESOS	MERCADOS		
	% TIENDONA	% CENTRAL	% SAN MIGUELITO
Queso duro blando	100.0	70.75	100.0
Queso fresco	88.57	56.6	84.78

Los porcentajes son basados en el número total de la guía de observación, observándose que estos son los dos quesos que se encuentran en todos los puestos de los tres mercados.

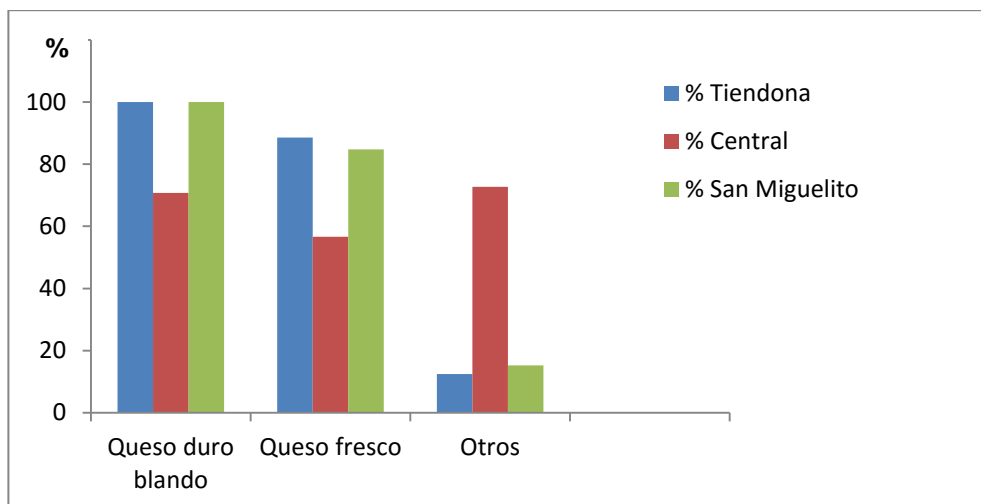


Figura N° 4 Tipos de quesos preferidos por los consumidores.

En la mayoría de los puestos de los mercados los quesos más comercializados son los quesos frescos y duro blando, reflejándose que los porcentajes de los otros quesos son bajos a comparación de los quesos frescos y duros blandos, por lo que se muestra que son los quesos más vendidos.

Cuadro N° 12 Puestos de los mercados que mantienen en refrigeración los quesos.

TIPOS DE QUESOS	MERCADOS		
	% TIENDONA	% CENTRAL	% SAN MIGUELITO
Queso duro blando	42.86	31.33	39.13
Queso fresco	80.0	63.33	65.22

Se puede observar que los porcentajes de los quesos duro blando son más bajos que los quesos frescos, en su mayoría los duro blando son los que están casi siempre a temperatura ambiente y a veces expuestos al ambiente.

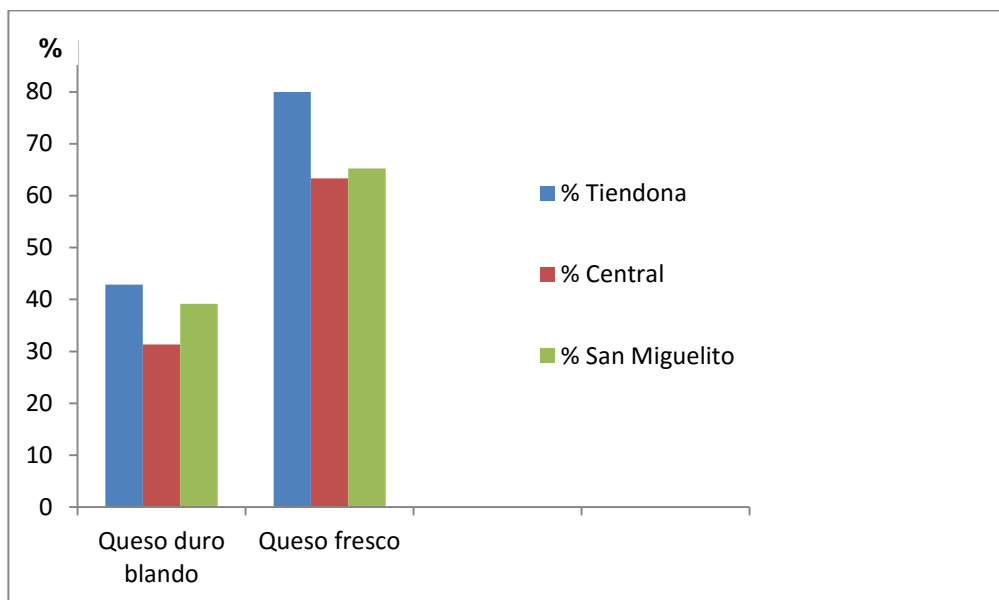


Figura N° 5 Quesos que se mantienen en refrigeración en los puestos de los mercados.

Se observa que los quesos frescos son los que tienen un porcentaje más elevado (80%, 63% y 65.22%) a mantenerse en refrigeración que los quesos duro blando, debido a que necesitan estar a una temperatura baja (temperatura teórica 4<sup>o</sup> C) para evitar la proliferación de las bacterias, por lo que no se sabe a qué temperatura mantienen las refrigeradoras los puestos de los mercados. También se observó que la mayoría mantienen los quesos duro blando a temperatura ambiente.

Cuadro N° 13 Medidas higiénicas tomadas en los puestos de los mercados para los quesos.

PREGUNTAS	MERCADOS						Observaciones
	TIENDONA		CENTRAL		SAN MIGUELITO		
	% SI	% NO	% SI	% NO	% SI	% NO	
Los quesos están separados de otros productos.	57.14	42.86	56.67	43.33	82.61	17.39	Embutidos, patis, chorizos, refrescos



Cuadro N° 13 (continuación).

PREGUNTA	MERCADO						OBSERVACIONES
	TIENDONA		CENTRAL		SAN MIGUELITO		
	% SI	% NO	% SI	% NO	% SI	% NO	
Los puestos y el personal cumplen con una debida higiene para los quesos.	14.28	85.71	54.0	46.0	13.04	86.96	La mayoría no cumple con una higiene adecuada
Manipulan los mismos utensilios para cortar los diferentes tipos de quesos.	85.71	14.28	84.67	15.33	86.96	13.04	Se observó que utilizan el mismo utensilio
Se observan limpios los recipientes donde se guardan dichos quesos.	28.57	71.43	34.67	65.33	34.78	65.22	En su mayoría no se observaron limpios
La persona que despacha el queso, es la misma que manipula el dinero.	42.86	57.14	58.0	42.0	45.65	54.35	Se observó que casi siempre es la misma

Se puede observar que no todos los puestos cumplen con las medidas de higiene. Debido al poco espacio que estos puestos suelen tener, al escaso personal; por lo que se da el problema que la persona que despacha los quesos es la misma que toma el dinero, manipulación del mismo utensilio para todos los productos que en su mayoría son de cortar, mantienen los quesos con otros productos; dando lugar a una contaminación cruzada ya sea de *L. monocytogenes* u otras bacterias. La mayoría de estos problemas se debe a la falta de orientación que las personas de los mercados poseen con respecto a las medidas higiénicas.

## 5.2 Identificación de *Listeria monocytogenes*

El muestreo se realizó en los mercados: la Tiendona, Central y San Miguelito, y posteriormente se codificaron las 60 muestras de queso fresco y duro blando según Anexo N° 7, para la verificación de la presencia o ausencia de *L.*

*monocytogenes*, los análisis se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, dando como resultado los datos que a continuación se presentan:

Cuadro N° 14 Resultados obtenidos para la identificación de listeria monocytogenes primer muestreo (20 muestras).

MUESTRAS	PRUEBAS PRESUNTIVAS				PRUEBAS CONFIRMATIVAS										RESULTADOS OBTENIDOS <i>L.monocytogenes</i>	Valor permitido por el RTCA <b>ausente.</b>
	Aislamiento selectivo				Pruebas bioquímicas											
	O	P	Ct	Tg	H	C	M	T S I	V P	R M	I	F C	A P I			
1AFC	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
<b>2AFC</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>Presente</b>	<b>No cumple</b>
3AFC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
4AFT	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
5AFSm	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
1ADC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
<b>2ADC</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>Presente</b>	<b>No cumple</b>
3ADC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
4ADT	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
5ADSm	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
1BFC	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
2BFC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
3BFC	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
4BFT	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
5BFSm	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
<b>1BDC</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>Presente</b>	<b>No cumple</b>
2BDC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
3BDC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
<b>4BDT</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>Presente</b>	<b>No cumple</b>
5BDSm	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple

**Nota:** += positivo, - = negativos, O= oxford, P= palcam, Ct= catalasa, Tg= tinción al gran, H= hemolisis, C= CAMP, M= movilidad, TSI= triple azúcar hierro, VP= voges proskauer, RM=rojo de metilo, I= indol, FC= fermentación de carbohidratos, API= API listeria.

Cuadro N° 15 Resultado obtenido para la identificación de *Listeria monocytogenes* segundo muestreo (20 muestras).

MUESTRAS	PRUEBAS PRESUNTIVAS			PRUEBAS CONFIRMATIVAS									RESULTADOS OBTENIDOS <i>L.monocytogenes</i>	Valor permitido por el RTCA ausente.	
	Aislamiento selectivo			Pruebas bioquímicas											
	O	Ct	Tg	H	C	M	TSI	VP	RM	I	FC	API			
1CFC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
<b>2CFC</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>Presente</b>	<b>No cumple</b>
3CFC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
<b>4CFT</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>Presente</b>	<b>No cumple</b>
<b>5CFSm</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>Presente</b>	<b>No cumple</b>
1CDC	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
2CDC	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
<b>3CDC</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>Presente</b>	<b>No cumple</b>
4CDT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
5CDSm	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
1DFC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
2DFC	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
3DFC	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
4DFT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
5DFSsm	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
<b>1DDC</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>Presente</b>	<b>No cumple</b>
<b>2DDC</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>Presente</b>	<b>No cumple</b>
3DDC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
<b>4DDT</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>Presente</b>	<b>No cumple</b>
5DDSm	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple

**Nota:** += positivo, - = negativos, O = oxford, Ct = catalasa, Tg = tinción al gran, H =hemolisis, C = CAMP, M = movilidad, TSI = triple azúcar hierro, VP = voges proskauer, RM =rojo de metilo, I = indol, FC = fermentación de carbohidratos, API= API listeria.

Cuadro N° 16 Resultado obtenido para la identificación de *Listeria monocytogenes* tercer muestreo (20 muestras).

MUESTRAS	PRUEBAS PRESUNTIVAS			PRUEBAS CONFIRMATIVAS									RESULTADOS OBTENIDOS <i>L. monocytogenes</i>	Valor permitido por el RTCA <b>ausente</b>	
	Aislamiento selectivo			Pruebas bioquímicas											
	O	Ct	Tg	H	C	M	TSI	VP	RM	I	FC	API			
1EFC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
2EFC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Presente	No cumple
3EFC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	No cumple
4EFT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
5EFSm	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
1EDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Presente	No cumple
2EDC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
3EDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
4EDT	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
5EDSm	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Presente	No cumple
1FFC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
2FFC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
3FFC	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
4FFT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Presente	No cumple
5FFSm	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
1FDC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
2FDC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
3FDC	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
4FDT	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple
5FDSm	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ausente	Cumple

**Nota:** += positivo, - = negativos, O = oxford, Ct = catalasa, Tg = tinción al gran, H = hemólisis, C = CAMP, M = movilidad, TSI = triple azúcar hierro, VP = voges proskauer, RM = rojo de metilo, I = indol, FC = fermentación de carbohidratos, API = api listeria.

Los resultados obtenidos de los cuadros anteriores nos reportan 15 muestras de quesos (6 quesos frescos y 9 duros blandos) con *L. monocytogenes* equivalente al 25% de las muestras analizadas, y 45 muestras en las que no está presente esta bacteria (es decir el 75%). El Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08 (Alimentos, criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos), en el subgrupo 1.8 y 1.9 de quesos madurados y no madurados (ver anexo N° 1), indica que el límite máximo permitido es ausencia

en 25g, por lo que estas muestras de quesos frescos y duro blando no cumplen con este parámetro.

### 5.3 Resultados obtenidos para la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes*.

Cuadro N° 17 Características físicas y organolépticas de los quesos frescos.

CARACTERISTICAS	QUESO FRESCO	
	1 día	5 días
Color	Blanco	Blanco - amarillo
Olor	Característico a lácteo	Característico a fermentado
Sabor teórico	Característico a lácteo y ligeramente salado	Agrio ligeramente salado
Textura	Masa semi-sólida	Masa semisólida y viscosa

Cuadro N° 18 Características físicas y organolépticas de los quesos duro blando.

CARACTERISTICAS	QUESO DURO BLANDO	
	1 día	5 días
Color	Blanco amarillento	Amarillo tenue
Olor	Característico a lácteo	Característico a lácteo viejo
Sabor	Característico a lácteo y ligeramente salado	Característico a lácteo y ligeramente salado
Textura	Semi-dura	Semi-dura y reseca

De los cuadros 5 y 6 podemos comparar que los quesos al pasar los días cambian sus características físicas y organolépticas, teóricamente debido a la presencia de otras bacterias que descomponen los quesos, como lo son los coliformes, *Pseudomonas sp*, los *Bacillus sp*. y otras (17,19).

La *Listeria monocytogenes* pertenece a la familia de los *Bacillus*, los cuales degradan proteínas produciendo olor y sabores anormales en los quesos frescos y duro blando, teóricamente otras bacterias como la *Pseudomonas spp.* aparte de producir malos olores y sabor agrio, produce defectos en la consistencia de los quesos.

#### 5.4 Comparación de los conteos en placa de 1 día y a los 5 días:

Los datos que se reportan solo son de las muestras que salieron positivas a *L. monocytogenes* como se describió en el literal 2.6.

El conteo de colonias en placas se multiplicó por la dilución  $10^{-1}$  y como resultado se obtuvo:

$$2\text{AFC}: 28 \text{ UFC} \times 10 = 280 \text{ UFC}$$

Cuadro N° 19 Resultados de los conteos en placa de *Listeria spp* los días 1y 5.

MUESTRA	1 DIA	5 DIAS
2AFC	280 UFC	970 UFC
2ADC	80 UFC	680 UFC
1BDC	370 UFC	2810 UFC
4BDT	450 UFC	2030 UFC
2CFC	230 UFC	300 UFC
4CFT	70UFC	170 UFC
5CFSm	250 UFC	410 UFC
3CDC	100 UFC	210 UFC
1DDC	150UFC	280UFC
2DDC	120UFC	340UFC
4DDT	40UFC	150UFC
2EFC	180UFC	530UFC
1EDC	90UFC	820UFC

Cuadro N° 19 (continuación).

MUESTRA	1 DIA	5 DIAS
5EDSm	10UFC	210UFC
4FFT	430UFC	65000UFC

De las muestras anteriores, se calculó el número de las colonias:

5 col. *L. spp* → 5 UFC *L. monocytogenes* (+) → 100%

Por lo tanto se tiene que:

5 UFC *L. spp* → 100%

5 UFC → 100%

5 UFC *L. m* → X

2 UFC → X

$$X = 100\%$$

$$X = 40\%$$

Se tiene que:

230UFC → 100%

X ← 40%

$$X = 92 \text{ UFC.}$$

Cuadro N° 20 Número total de colonias positivas de *L. monocytogenes* del día 1.

<b>Muestras</b>	<b><i>Listeria. spp</i> UFC/g</b>	<b><i>L. monocytogenes</i> UFC/g</b>	<b><i>L. monocytogenes</i> %</b>	<b>Log</b>
<b>2AFC</b>	280	280	100	2.45
<b>2ADC</b>	80	80	100	1.90
<b>1BDC</b>	370	370	100	2.57
<b>4BDT</b>	450	450	100	2.65
<b>2CFC</b>	230	92	40	1.96
<b>4CFT</b>	70	28	40	1.45
<b>5CFSm</b>	250	250	100	2.39
<b>3CDC</b>	100	30	30	1.48
<b>1DDC</b>	150	120	80	2.08
<b>2DDC</b>	120	72	60	1.86
<b>4DDT</b>	40	16	40	1.20
<b>2EFC</b>	180	144	80	2.16
<b>1EDC</b>	90	54	60	1.73
<b>5EDSm</b>	100	100	100	2.00
<b>4FFT</b>	430	344	80	2.54



Cuadro N° 21 Número total de colonias positivas de *L. monocytogenes*, del día 5.

<b>Muestras</b>	<b><i>Listeria. spp</i> UFC/g</b>	<b><i>L. monocytogenes</i> UFC/g</b>	<b><i>L. monocytogenes</i> %</b>	<b>Log</b>
<b>2AFC</b>	970	970	100	2.99
<b>2ADC</b>	680	680	100	2.83
<b>1BDC</b>	2810	2810	100	3.45
<b>4BDT</b>	2030	2030	100	3.31
<b>2CFC</b>	300	120	40	2.08
<b>4CFT</b>	170	68	40	1.83
<b>5CFSm</b>	410	410	100	2.61
<b>3CDC</b>	210	63	30	1.80
<b>1DDC</b>	280	224	80	2.35
<b>2DDC</b>	340	204	60	2.31
<b>4DDT</b>	150	60	40	1.78
<b>2EFC</b>	530	424	80	2.63
<b>1EDC</b>	820	492	60	2.69
<b>5EDESm</b>	210	210	100	2.32
<b>4FFT</b>	65000	52000	80	4.72

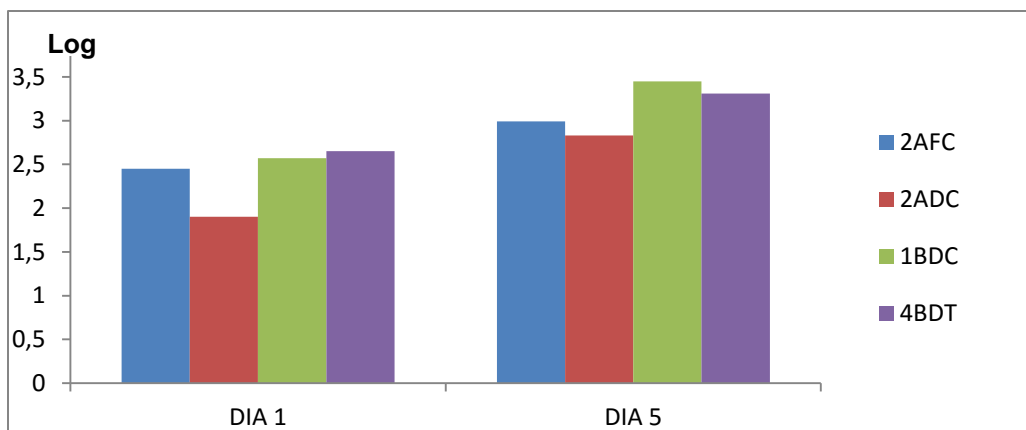


Figura N° 6 Primer muestreo, muestras positivas de *L. monocytogenes*.

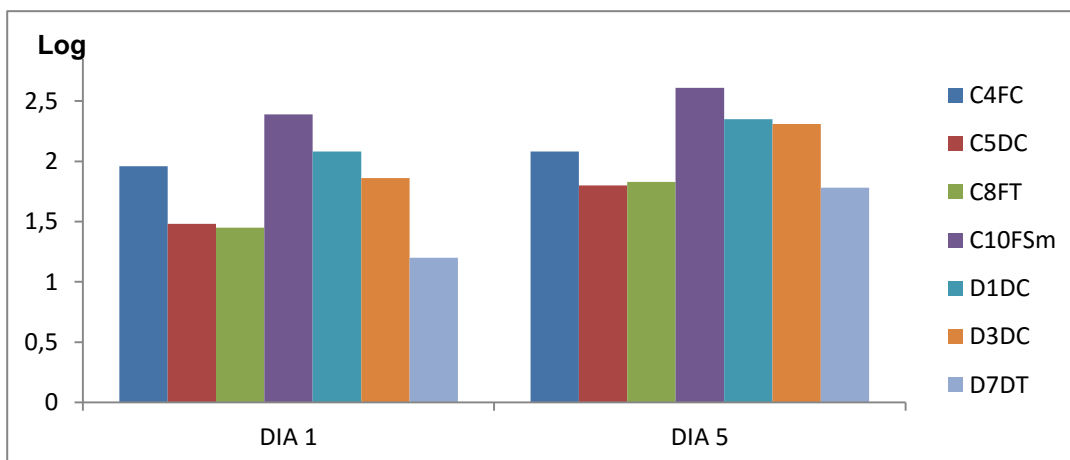


Figura N° 7 Segundo muestreo, muestras positivas de *L. monocytogenes*.

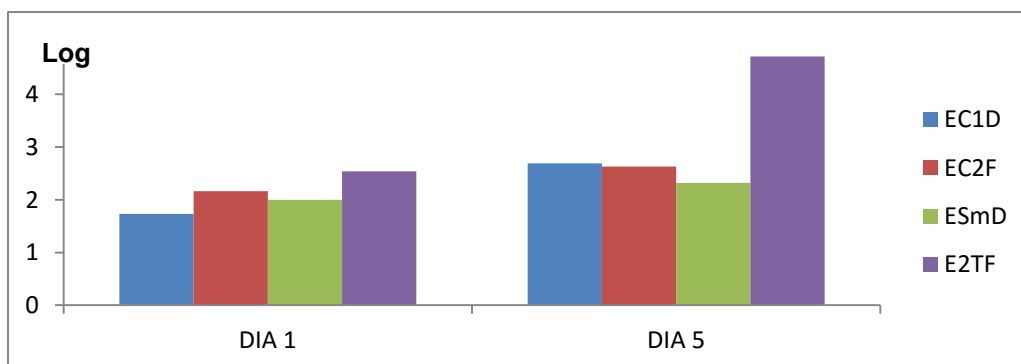


Figura N° 8 Tercer muestreo, muestras positivas de *L. monocytogenes*.

Al comparar estos resultados en las figuras N° 6, 7, 8 nos muestran el

crecimiento de *L. monocytogenes* con respecto al tiempo. La bacteria fue sometida a una temperatura de 4°C por 5 días, para ver su proliferación, lo cual nos representa que *L. monocytogenes* consumió el sustrato de los quesos y la cantidad de sal que estos contienen, por lo que le dio a la bacteria condiciones adecuadas para poder sobrevivir; debido a que esta prolifera a un rango de temperatura de 1 - 45°C y a una elevada concentración de sal. Los resultados nos muestran que de 30 muestras de queso duro blando 9 salieron contaminados y de 30 muestras de queso fresco 6 salieron contaminados. Los quesos duro blando son los más contaminados por dicha bacteria, debido a la concentración elevada de sal que estos poseen.

**CAPITULO VI**  
**COCLUSIONES.**

## 6.0 CONCLUSIONES.

1. Los resultados obtenidos en la guía de observación mostraron que las dos variedades de quesos (frescos y duro blando) comercializados en los tres mercados obtuvieron los porcentajes más elevados: Tiendona: queso fresco 88.57%, duro blando 100%; Central: fresco 56.6%, duro blando 70.75%; San Miguelito: fresco 84.78%, duro blando 100%.
2. Los resultados de la guía de observación nos mostró, la falta de higiene en un 72.89% que estos puestos poseen en sus instalaciones en los mercados donde se comercializan quesos y otros productos.
3. Los resultados obtenidos de las muestras de quesos analizadas fueron el 10% de queso fresco y el 15% de duro blando contaminadas con *L. monocytogenes*, por lo que puede ser dañino a la población salvadoreña.
4. Se comprobó la sobrevivencia de *L. monocytogenes*, con la comparación del día 1 con respecto al quinto día, mostrándonos que la bacteria tuvo condiciones adecuadas como sustrato, salinidad y temperatura óptima para poder proliferar.
5. Las muestras analizadas demuestran que no cumplen con lo especificado por el Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08 (Alimentos, Criterios Microbiológico para la Inocuidad de Alimentos) de quesos madurados y no madurados, el cual nos dice que por cada 25g de muestra analizada el Límite máximo permitido es Ausencia de *L. monocytogenes*.

**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES.**

## 7.0 RECOMENDACIONES.

1. Que al elaborar el queso se debe cumplir con las condiciones higiénicas adecuadas, ya que esta es una de las mayores fuentes de contaminación.
2. Evitar el consumo de quesos frescos y duro blando de dudosa procedencia, debido a que los puestos de los mercados no cumplen con las medidas higiénicas para evitar adquirir listeriosis u otros microorganismos.
3. Que los puestos de los mercados no deben comercializar otros productos que estén cerca de los quesos, ya se puede ocasionar una contaminación cruzada con *L. monocytogenes* u otro microorganismo.
4. Que las personas con sistema inmune suprimido, ancianos, personas con una estricta dieta rigurosa, mujeres embarazadas no deben de consumir queso frescos y duro blando de dudosa procedencia para evitar el riesgo de adquirir listeriosis.
5. A los inspectores de saneamiento que deben aumentar el monitoreo de los mercados, así como la institución respectiva gestione capacitaciones que los lleve a implementar un procedimiento de limpieza y sanitización de los puestos de venta de alimentos, para poder tener un mejor control y erradicación del microorganismo patógeno *de L. monocytogenes*.
6. Que el Ministerio de Salud refuerce el sistema de monitoreo para realizar análisis microbiológico de quesos frescos y duro blando, en las zonas rurales y urbanas donde es su mayor elaboración, e implementar el uso de leche pasteurizada para la elaboración de quesos, para que exista

una mejor verificación del cumplimiento de la presencia o ausencia del microorganismo patógeno de *L. monocytogenes* u otro microorganismo.



## 8.0 BIBLIOGRAFIA

1. Administración Municipal de Mercados: La Tiendona, Central y San Miguelito, Alcaldía Municipal de San Salvador, Comunicación escrita, abril del 2013. [Consultado]:10-04-13
2. Alberti, C. L. "Determinación de la calidad microbiológica de superficies internas de refrigeradores en hogares del área metropolitana de san salvador, 2011. Universidad de El Salvador. [Consultado]:11-03-13.
3. Aguirre, C. y otros. Análisis físico y químico de productos lácteos (leches y cremas) del área metropolitana de San Salvador en el periodo de noviembre 1994 a junio 1995, universidad de El Salvador. [Consultado]:11-03-13.
4. Amaya, W. y otros "Determinación de *Listeria monocytogenes* en mortadela y jamones no empacados al vacío que se comercializan en el área metropolitana de San Salvador en el periodo 2003", 2004. Universidad de El Salvador. [Consultado]:11-03-13.
5. BAM, F.D.A (Food and Drug Administration of United Status) 1998. Bacteriological Analytical Manual (BAM) 8ª edition capítulo 10 y 12. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm> [Consultado]:15-03-13.
6. Bonilla, G. Estadística II, métodos prácticos de inferencia estadística, segunda edición, UCA editores, 1997. [Consultado]:25-03-13.

7. Cano, F. y otros. Segundo Seminario Marschall sobre quesos, Guatemala, 1983. [Consultado]:25-03-13.
8. Comisión del CODEX Alimentarius, manual de procedimiento, 7ª Edición, 1989. [Consultado]:25-03-13.
9. Comisión del CODEX Alimentarius, manual de procedimiento, 19ª Edición, 2010. [Consultado]:25-03-13.
10. CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) Norma Salvadoreña NSO 67.01.04:95. "Queso no madurado especificaciones "; San Salvador, El Salvador 1995. [Consultado]:25-03-13.
11. "Definición de *Listeria monocytogenes*." <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/foodborn/lister.htm>. [Consultado]: 10-04-13.
12. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/111111/attachment](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/111111/attachment). [Consultado]: 20-11-15
13. Fernández, G. Estudio de los tratamientos por la alta presión hidrostática en la leche de vaca. Universidad Catalana, España, 2001. [Consultado]:10-04-13.
14. González, V. "Identificación de *Listeria monocytogenes* en carne de res cruda comercializada en los principales supermercados en el área metropolitana de San Salvador" .2008. Universidad de el Salvador. [Consultado]:12-04-13.

15. Hernández, G. "Propuesta para la implementación de buenas prácticas de manufactura de alimentos preparados en sección de cocina en el mercado municipal San Miguelito". 2010, Universidad de El Salvador. [Consultado]: 21-03-15.
16. Hernández, R. Metodología de la investigación. Tercera edición, Mc Graw Hill. 2003. [Consultado]:12-04-13.
17. Jawetz, E. y otros. Microbiología médica, 15a Edición México D.F. Editorial el manual modern S.A. 1996. [Consultado]:12-04-13.
18. Jackson, KA. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* associated with Mexican-style cheese made from pasteurized milk among pregnant, Hispanic women. 2011 Jun. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> [Consultado]:25-03-13.
19. Kosikowski, F.V. cheese and fermented milks foods, Edwards Bros., Inc., Ann Arbor, Mich U.S.A. 1970. [Consultado]:12-04-13.
20. Kosikowski, F.V. cheese and fermented milks foods, Edwards Bros., Inc., Ann Arbor, Mich U.S.A. 1972. [Consultado]:10-04-13.
21. López, A. y otros. Evaluación microbiológica de los tipos de quesos cápita, cuajada y morolique. Universidad Evangélica 1992. [Consultado]: 14-03-13.
22. Luquet, F.M. Leche y productos lácteos, de la mama a la lechería, Ed. Acribia S.A. Zaragoza .España, Vol. #1. 1991. [Consultado]:14-03-13.

23. Luquet, F.M. Leche y productos lácteos, transformación y tecnología, Ed. Acribia S.A. Zaragoza España, Vol. #2, 1991. [Consultado]:14-03-13.
24. MacDonald, PD. Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese, Jan 31 2005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15714412> [Consultado]: 28-03-13.
25. Manual de Procedimiento Enumeración Listeria Monocytogenes en Alimentos ISO 11290-2. Modificado. [www.ispch.cl/content/procedimiento-enumeracion-listeria](http://www.ispch.cl/content/procedimiento-enumeracion-listeria) [Consultado]: 20-11-15
26. Manzano, H. y otros. Evaluación de la calidad microbiológica de yogurt comercializado en la ciudad de San Salvador, Universidad de El Salvador.1998. [Consultado]: 19-03-13.
27. Martínez, H. Determinación de calidad de leches crudas y quesillo, elaborado artesanalmente en plantas productoras de lácteos, área metropolitana de San Salvador, 2004. [Consultado]: 29-03-13.
28. MERCK (Manual de Medios de Cultivo Deshidratados), Darmstadt, Alemania 1994. [Consultado]: 19-03-13.
29. Montes, V. y otros. Diagnóstico de la aplicación de la Norma Salvadoreña Obligatoria NSO 67.01.04:95; quesos no madurados que se comercializan en dos mercados del área metropolitana de San Salvador. 1999. Universidad Dr. José Matías Delgado. [Consultado]:11-04-13.

30. Nutrition Hospital. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Idiazabalcheese. Arrese 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. [Consultado]: 04-04-13.
31. Padilla, R y otros. Evaluación de leches pasteurizadas en El Salvador. Universidad Salvadoreña Alberto Másferrer, junio, 1998. [Consultado]: 8-04-13.
32. Pascual, C. Los problemas más frecuentes en la fabricación de quesos, Industrias lácteas Españolas, 1982. [Consultado]:3-04-13.
33. Pérez, M. P.” Determinación de la resistencia en cepas de *Listeria monocytogenes* aislada a partir de muestras de espinaca spinaceaoleracea utilizando germicidas para la desinfección de alimentos”, 2012. Universidad de El Salvador. <http://ri.ues.edu.sv/2311/> [Consultado]: 02-04-13.
34. Potter, N. Ciencia de los alimentos, editorial Acribia, Zaragoza España, de la edición de la lengua española, 1999. [Consultado]:3-04-13.
35. R, Scott. Fabricación del queso. Segunda Edición, Imprenta ACRIBIA, Zaragoza, 2002. Universidad Dr. José Matías Delgado. [Consultado]:29-03-13.
36. Renaloea. Análisis microbiológico de los alimentos. [http://www.anmat.gov.ar/rena-Loa/docs/Analisis\\_microbiologico\\_de\\_los\\_alimentos\\_Vol\\_I.pdf](http://www.anmat.gov.ar/rena-Loa/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf) [Consultado]: 15-03-13

37. Rivas, R. y otros. Determinación de la calidad microbiológica del requesón que se comercializa en los principales mercados de la zona metropolitana de San Salvador, 2008. [Consultado]:28-03-13.
38. RTCA (Reglamento Técnico Centro Americano). [http://members.wto.org/crnattaments/2008/tbt/CRI/08\\_0979\\_00\\_s.pdf](http://members.wto.org/crnattaments/2008/tbt/CRI/08_0979_00_s.pdf) [consultado]: 05-03-13.
39. Rosales, S. C. de Leiva, "Análisis fisicoquímico y microbiológico del queso semi-duro distribuido en algunos supermercados del área metropolitana de San Salvador", UNSA 2005. [Consultado]:28-03-13.
40. Ramírez, J. A. Montalván, "Análisis microbiológico y físico-químico del requesón distribuido en los supermercados y mercados del distrito centro histórico y distrito III de San Salvador," UNSA 2007. [Consultado]:28-03-13
41. Eroski, Temperatura de leche evaporada." <http://www.consumer.es/web/Es/alimentación/guía-alimentos/leche-y-derivados/2002/04/02/40213.php> [Consultado]:04-04-13.
42. Valle, J. C. "Determinación de la calidad microbiológica de dos variedades de quesos, comercializados en la zona uno del área metropolitana de San Salvador," Universidad de El Salvador, 2012. [Consultado]: 16-02-13.
43. Zamorán. D. Manual de Procesamiento Lacteo. JICA "[http://www.jica.go.Nicaragua/español/office/others/c8h0vm000001q4bc-att/14\\_agriculture01.pdf](http://www.jica.go.Nicaragua/español/office/others/c8h0vm000001q4bc-att/14_agriculture01.pdf). [Consultado: 21-03-15].

## 9.0 GLOSARIO

**Alimento:** toda sustancia, elaborada, semielaborada o bruta, que se destina al consumo humano, incluyendo las bebidas, el chicle y cualesquiera otras sustancias que se utilicen en la fabricación, preparación o tratamiento de los alimentos <sup>(8)</sup>.

**Bacterias:** grupos de microorganismos unicelulares que se multiplican por partición simple. También son llamados microbios <sup>(17)</sup>.

**Bacterias mesófilas:** bacterias con temperatura óptima de crecimiento dentro de límites regulares (15-45°C) <sup>(15)</sup>.

**Bacterias psicótropas:** bacterias capaces de crecer a bajas temperaturas (10-20°C) <sup>(15)</sup>.

**Calostro:** secreción densa, cremosa y amarilla que es recolectada de la ubre de la vaca después del parto. Por definición únicamente la secreción del primer ordeño después del parto puede ser denominada calostro <sup>(22)</sup>.

***Escherichia coli:*** bacilo gram negativo, cuyas cepas enteropatógenas son habitantes casi universales de las vías intestinales de los humanos y los animales de sangre caliente, tienen un papel nutricional importante en las vías intestinales, en especial vitamina K. Es patógena cuando la resistencia del huésped es baja, se le relaciona con las infecciones disentéricas y las fiebres generalizadas <sup>(15,21)</sup>.

**Esterilización:** destrucción de los microorganismos que pueden haber en un objeto, mediante medios físicos, especialmente calor y presión o químicos, con los llamados antisépticos; desinfección <sup>(15,43)</sup>.

**Fermentación:** movimiento o agitación de las partículas de un líquido que se transforma o entra en descomposición (19,20).

**Higiene de los alimentos:** comprende las condiciones y medidas necesarias para la producción, elaboración, almacenamiento y distribución de los alimentos destinados a garantizar un producto inocuo, en buen estado y comestible, apto para el consumo humano (15,43).

**HTST:** método de pasteurización a 70°C por 15 segundos, que mata gran cantidad de bacterias, es más lento que el UHT, pero más económico puesto que no se necesita tanto dinero para la maquinaria requerida y es frecuentemente utilizado para lácteos como yogures y leches(31,41).

**Inocuidad:** garantía de que un alimento no causará daño al consumidor cuando este sea preparado e ingerido de acuerdo al uso al que se destine (9,43).

**Lactosa:** el azúcar de la leche que se encuentra en la leche de los mamíferos (41).

**Leche:** es la secreción obtenida por el ordeño completo de una vaca o más vacas sanas que contenga no menos del 3% de grasa y no menos del 85% de sólidos lácteos no grasos y que está libre de calostro. Se presumirá que la leche contiene calostro cuando se obtiene dentro del término 15 días anteriores y posteriores al parto o 15 días después del mismo (10, 22,26).

**Microbiota:** Conjunto de microorganismos (bacterias y hongos) de determinado tejido de un hospedador que han desarrollado una relación íntima con este y que normalmente desempeñan funciones benéficas (7,17).

**Pasteurización:** es un proceso que consiste en calentar cada partícula de leche o productos lácteos a una temperatura y durante un periodo de tiempo



mínimo, que sean necesarios para destruir todos los agentes patógenos que puedan contener. Su finalidad es destruir gérmenes infecciosos (9, 13,31).

**Proteína caseína en leche:** la caseína es una de las proteínas que se dirige con más facilidad y constituyen la fracción mayor de las sustancias proteicas de la leche (aproximadamente un 80%). El rendimiento mayor o menor que se obtiene en la producción o procesamientos en los quesos se debe al porcentaje mayor o menor de grasas y caseína que contiene la leche. El color blanco que contiene la leche se debe al caseinato de calcio que contiene (23, 26, 34,43).

**Proteólisis:** degradación de proteínas ya sea mediante enzimas específicas llamadas proteasas o por medio de digestión intermolecular (20, 23,25).

**Queso:** es el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido por la coagulación de leche, leche descremada, leche parcialmente descremada, crema, crema de suero o suero de mantequilla o una combinación cualquiera de estas, por la acción del cuajo u otros coagulante apropiados, con o sin aplicación del calor, y con o sin la adición de otros ingredientes aditivos alimentarios (8, 23, 32,35).

**Queso fresco:** es el queso no madurado ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular, preparado con leche entera semidescremada cuajada con enzimas y ácidos orgánicos, generalmente sin cultivos lácticos. También se designa como queso blanco (8, 32,35).

**Queso no madurado:** es el queso que está listo para su consumo inmediatamente después de su fabricación (9, 29,39).

**Reglamento Técnico Salvadoreño:** es un documento en el que se establecen las características de los bienes en sus procesos y métodos de producción

conexos, incluidas las disposiciones administrativas aplicables, y cuya observancia es obligatoria (38).

**Salmonella:** bacillo gram-negativo. Es patógena ya sea en el hombre o en otros animales de sangre caliente. En los humanos las enfermedades más comunes causadas por salmonella son la fiebre tifoidea y la gastroenteritis (9,17).

**Sanidad:** conjunto de servicios gubernamentales para la salud del común de habitantes, de una provincia o de un municipio (15,36).

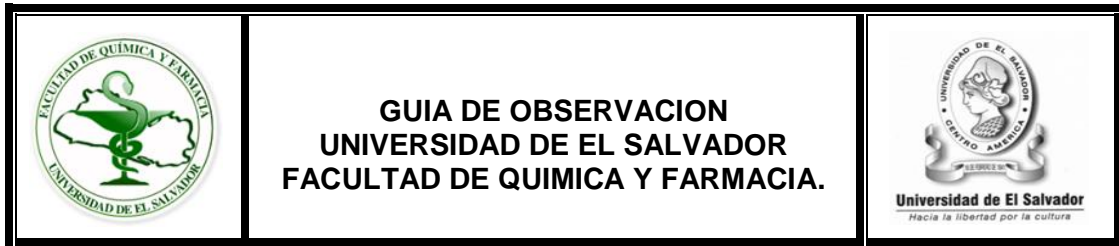
**Stapylococcus aureus:** bacteria gram-positiva es parásito frecuente de los humanos, animales y en ocasiones originan infecciones serias. Es una forma pigmentada amarilla que se relaciona con procesos patológicos incluyendo: neumonía, osteomielitis, meningitis y artritis (17,36).

**Ultrafiltración:** se usa para aumentar el porcentaje de las proteínas en la leche líquida como método para fortificar las proteínas de la misma. Este proceso permite que las propiedades de las proteínas de la leche de manera natural mejoren su sabor y textura y que no se requiera adicionar leche en polvo sin grasa, lo que con frecuencia causa que la leche líquida sepa cómo cocida o más dulce, por el exceso de lactosa de la leche en polvo sin grasa. Las variedades resultantes sin grasa o bajas en grasa tienen el mismo sabor y textura que la leche entera, sin las grasas adicionales (13, 31,41).

## **ANEXOS**

## ANEXO N° 1

### GUIA DE OBSERVACION



Realizada en los diferentes mercados: Central, Tiendona y San Miguelito, ubicados en la zona de San Salvador con el objetivo de determinar los dos diferentes tipos de quesos más consumidos, dentro de los puestos de dichos mercados.

1. De los siguientes tipos de quesos ¿Cuáles poseen en existencia en el puesto?

- |                     |                          |                       |                          |
|---------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
| - Quesillo          | <input type="checkbox"/> | - Queso fresco        | <input type="checkbox"/> |
| - Queso duro blando | <input type="checkbox"/> | - Queso cremado       | <input type="checkbox"/> |
| - Queso duro viejo  | <input type="checkbox"/> | - Otros(especifique): | _____                    |
| - Queso de cápita   | <input type="checkbox"/> |                       |                          |

2. De acuerdo a los resultados de la pregunta No.1, seleccionar los dos tipos de quesos preferidos por los consumidores.

- |                     |                          |                       |                          |
|---------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
| - Quesillo          | <input type="checkbox"/> | - Queso fresco        | <input type="checkbox"/> |
| - Queso duro blando | <input type="checkbox"/> | - Queso cremado       | <input type="checkbox"/> |
| - Queso duro viejo  | <input type="checkbox"/> | - Otros(especifique): | _____                    |
| - Queso de cápita   | <input type="checkbox"/> |                       |                          |

3. De los dos quesos seleccionados, ¿Cuántos puestos mantienen en refrigeración estos quesos?

---

4. ¿Los quesos están separados de otros productos?

SÍ  NO

Especifique que otros:

---

5. ¿Los puestos y el personal cumplen con una debida higiene para los quesos?

Sí  No

6. ¿Manipulan el mismo utensilio para cortar los diferentes tipos quesos?

Sí  No

7. ¿Se observan limpios los recipientes donde se guardan dichos quesos?

Sí  No

8. ¿La persona que despacha el queso, es la misma que manipula el dinero?

Sí  No

## ANEXO N° 2

### ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS PARA QUESOS FRESCOS Y DUROS BLANDOS ESTABLECIDOS POR EL REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO RTCA 67.04.50:08<sup>(38)</sup>

<b>1.8 subgrupo de alimento: Quesos madurados y procesados</b>			
<b>Parámetro</b>	<b>Categoría</b>	<b>Tipo de riesgo</b>	<b>Límite máximo permitido.</b>
<i>Escherichia coli</i>	5	A	< 10 UFC / g
<i>Staphylococcus aureus</i>	7		10 <sup>3</sup> UFC / g
<i>Listeria monocytogenes</i> / <b>25g</b>	10		Ausencia
<i>Salmonella ssp</i> / 25g	10		Ausencia

<b>1.9 subgrupo de alimento: Quesos frescos, no madurados y requesón.</b>			
<b>Parámetro</b>	<b>Categoría</b>	<b>Tipo de riesgo</b>	<b>Límite máximo permitido.</b>
<i>Escherichia coli</i>	5	A	< 10 UFC / g
<i>Staphylococcus aureus</i>	7		10 <sup>3</sup> UFC / g
<i>Listeria monocytogenes</i> / <b>25g</b>	10		Ausencia
<i>Salmonella ssp</i> / 25g	10		Ausencia

- **La categoría 10** se emplea en otros microorganismos considerados peligrosos como *Salmonella*, *Clostridium botulinum*, entre otros.

Categoría 10: plan de 2 clases, donde n= 5 y c= 0.

- **5.1.1 Riesgo tipo A:** Comprende los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tienen una alta probabilidad de causar daño a la salud.

### ANEXO N° 3

Cuadro N° 22 Listado de los mercados municipales del Área metropolitana San Salvador (1).

Mercados	Código	Número de puestos	Puestos a muestrear
La Tiendona	T	35	3
Central	C	212	1
San Miguelito	SM	46	1



Figura N° 9 Mapa de la zona metropolitana de San Salvador

**ANEXO N° 4**

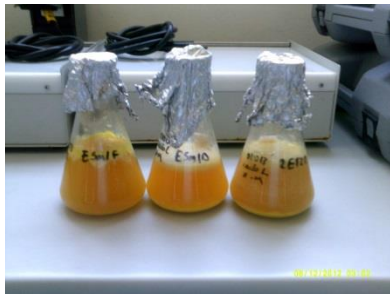
**PROCEDIMIENTOS ANALITICOS**



## ENRIQUECIMIENTO DE LA MUESTRA



Pesar 25g de la muestra de queso duro blando o queso fresco



225mL de caldo de enriquecimiento para listeria



STOMACHER 260 rpm por 3 minutos.



Incubar 35°C por 24 – 48 horas

Figura N° 10 Esquema de enriquecimiento de la muestra.

**Aislamiento:**



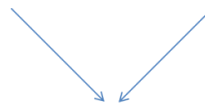
LEB



OXFORD



PALCAM



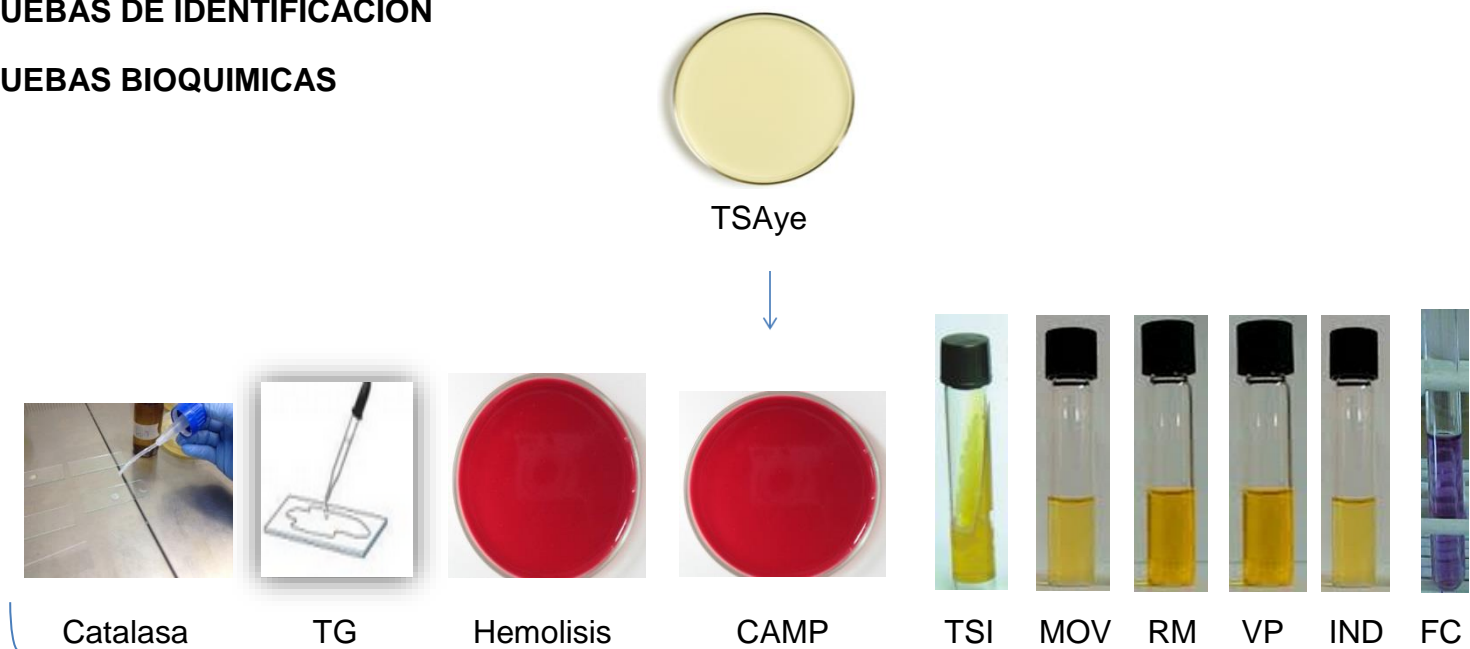
Incubar 35 °C. 24-48 h



Incubar 4 °C, 24-48 h

Figura N° 11 Esquema de aislamiento de la cepa

**PRUEBAS DE IDENTIFICACION**  
**PRUEBAS BIOQUIMICAS**



TG: Tinción al Gram.

MOV: Movilidad.

RM: Rojo de metilo.

VP: Voges - Proskauer.

IND: Indol.

FC: Fermentación de carbohidratos.

Incubar 35 °C, 24 h

Incubar solo el tubo "FC" a temperatura ambiente por 7 días

Figura N° 12. Esquema de pruebas bioquímicas.

### 1) Prueba de CAMP

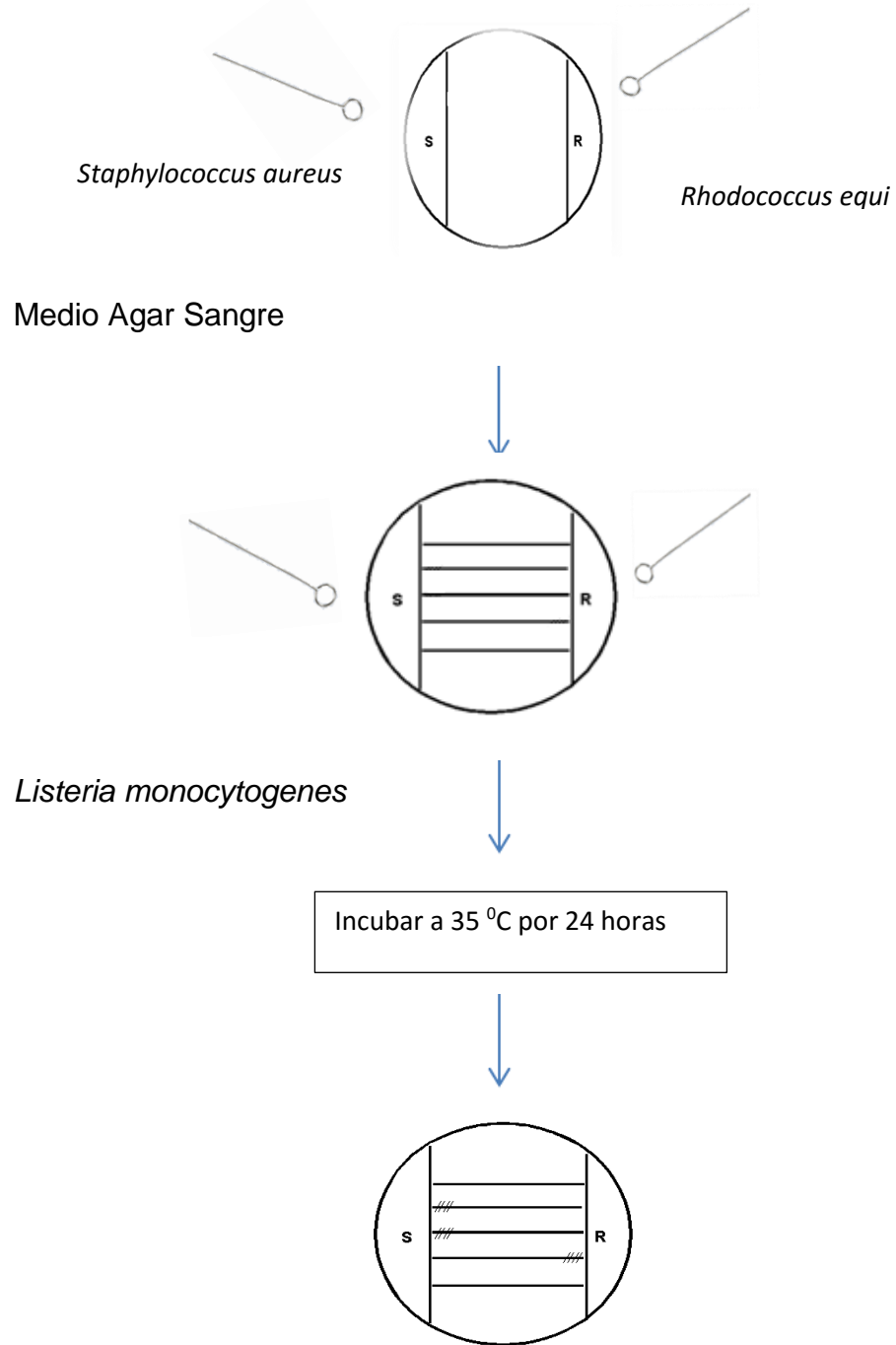


Figura N° 13. Esquema prueba de CAM

## 2) TINCIÓN AL GRAM

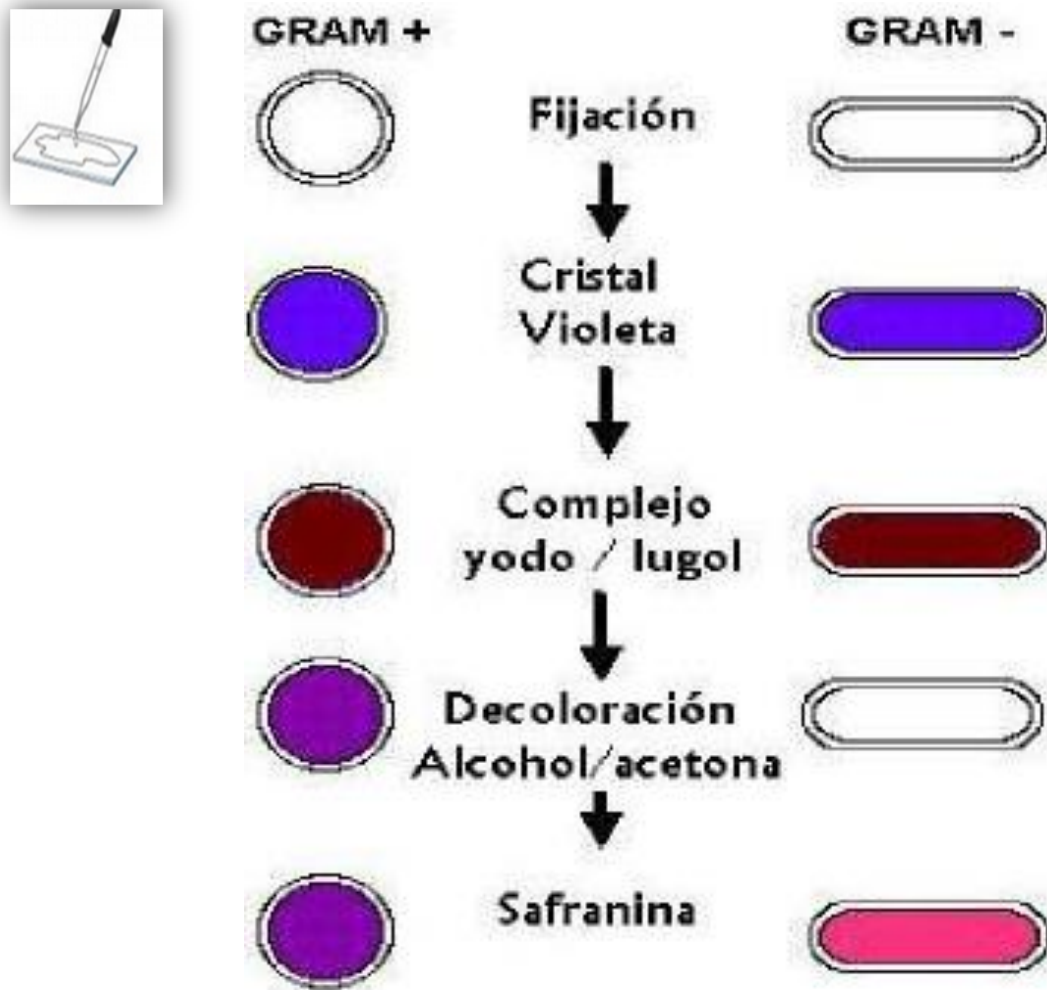


Figura Nº 14. Tinción al Gram

**ANEXO Nº 5**

**RESULTADOS DE *L. monocytogenes***

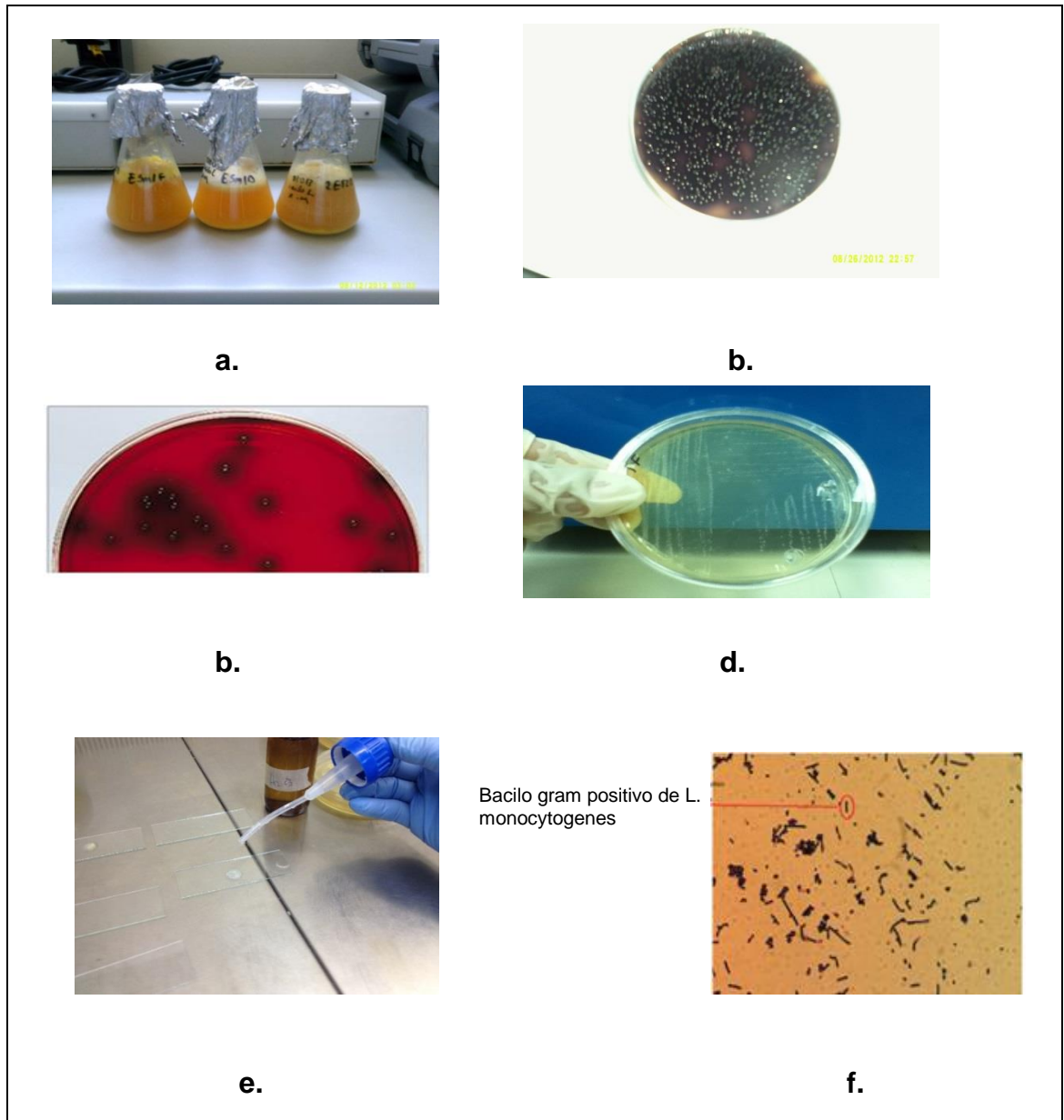


Figura N° 15. **a** = Caldos de enriquecimiento para *Listeria*; **b** = Agar OXFORD modificado. *L. monocytogenes*, colonias típicas pequeñas (aproximadamente 1mm) y rodeadas por un halo de oscurecimiento; **c** = Agar PALCAM para *Listeria*: Colonias típicas pequeñas, rodeadas de un halo de oscurecimiento; **d** = colonias típicas en el medio TSAye; **e** = prueba de catalasa para *Listeria monocytogenes*; **f** = tinción al gram para *L. monocytogenes*.

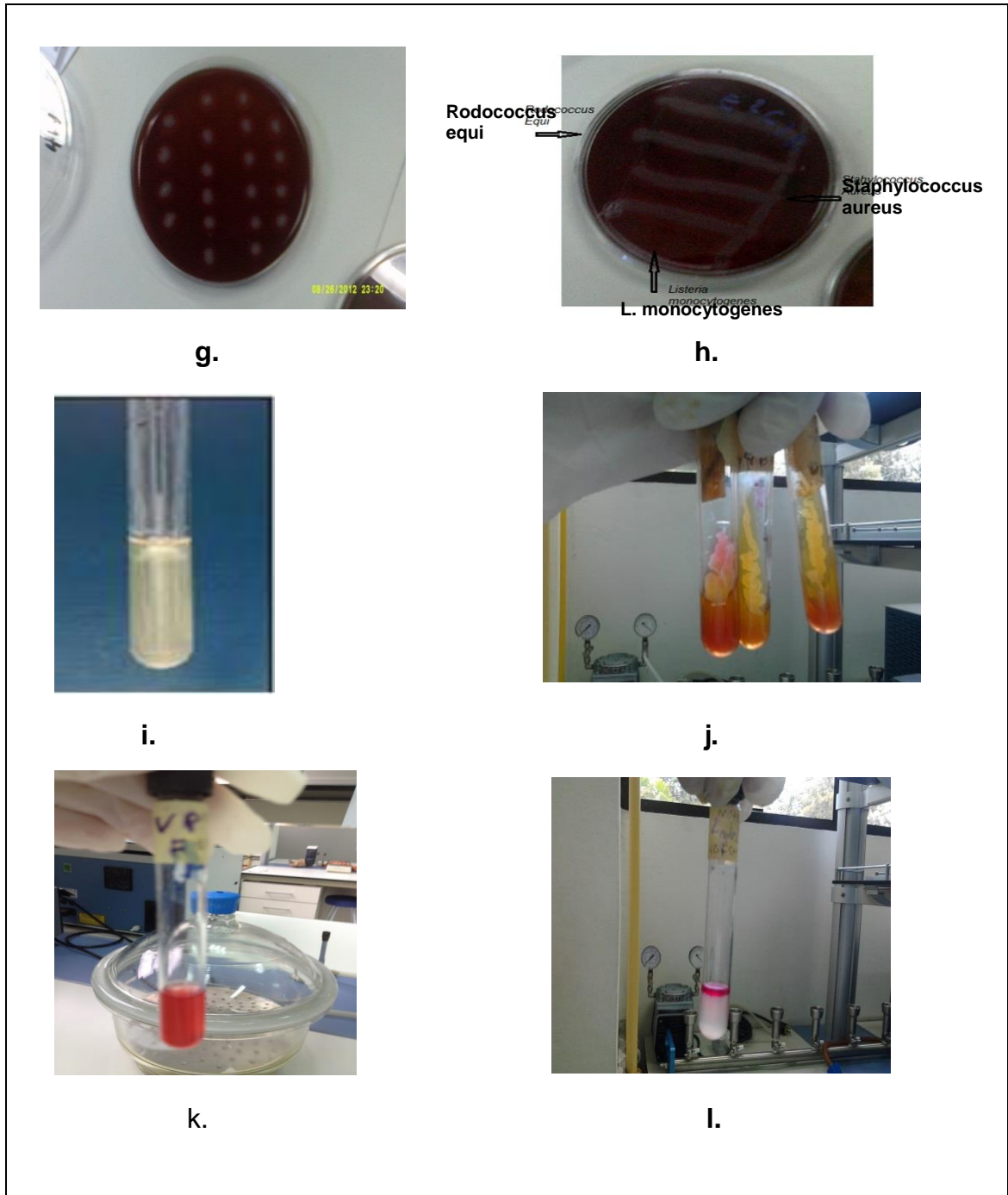
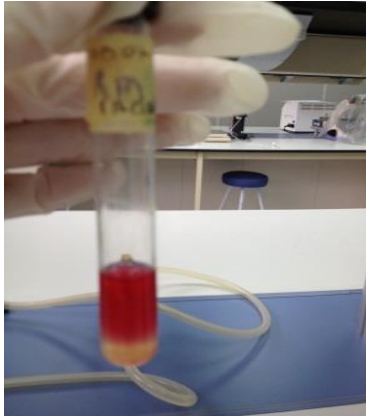


Figura N° 16. **g** = prueba de hemólisis para *L. monocytogenes*; **h** = prueba del CAMP para *L. monocytogenes*; **i** = prueba de motilidad para *L. monocytogenes*; **j** = prueba del TSI para *L. monocytogenes*; **k** = prueba de Voges – proskauer; **l** = prueba de indol.





**m.**



**n.**



**o.**

Figura N° 17. **m** = prueba de rojo de metilo; **n** = fermentación de Carbohidratos (ramnosa); **o** = tés de API listeria

## ANEXO N° 6

### MATERIALES Y EQUIPOS

#### Material:

- Agitador de vidrio
- Asa Bacteriológica
- Beaker de 30, 50, 100, 400, 600, 1000 mL
- Erlenmeyer de 125, 20, 1000,2000mL
- Gradillas para tubos de ensayo
- Mechero Bunsen
- Micropipeta de 10  $\mu$ L
- Pipeta de morh de 1.0 mL, 5.0 mL y 10.0 mL
- Placas de Petri
- Porta objetos
- Probetas de 10, 25. 50, 100, 500, 1000mL
- Tubos para pruebas bioquímicas.
- Baja lenguas.
- Palillos estériles.

#### Equipo:

- Autoclave
- Balanza Semianalítica
- Cabina de flujo laminar
- Estufa
- Hot Plate
- Incubadora
- Refrigerador.
- Stomacher
- Cuenta colonias

**ANEXO N° 7**

**CODIGOS DE LAS MUESTRAS**

Cuadro Nº 23 Códigos de las muestras del segundo y tercer muestreo

<b>Segundo muestreo</b>	
Primer código	Código nuevo
C1DC	1CDC
C2FC	1CFC
C3DC	2CDC
C4FC	2CFC
C5DC	3CDC
C6FC	3CFC
C7DT	4CDT
C8FT	4CFT
C9DSm	5CDSm
C10FSm	5CFSm
D1DC	1DDC
D2FC	1DFC
D3DC	2DDC
D4FC	2DFC
D5DC	3DDC
D6FC	3DFC
D7DT	4DDT
D8FT	4DFT
D9DSm	5DDSm
D10FSm	5DFSm

<b>tercer muestreo</b>	
Primer código	Código nuevo
EC1F	1EFC
EC1D	1EDC
EC2F	2EFC
EC2D	2EDC
EC3F	3EFC
EC3D	3EDC
ET1F	4EFT
ET1D	4EDT
ESmF	5EFSm
ESmD	5EDSm
E2C1F	1FFC
E2C1D	1FDC
E2C2F	2FFC
E2C2D	2FDC
E2C3F	3FFC
E2C3D	3FDC
E2TF	4FFT
E2TD	4FDT
E2SmF	5FFSm
E2SmD	5FDSm

Cuadro N° 24. Significado Códigos de las muestras

Número de puesto.	Orden de muestreo.	Queso fresco y duro blando.	Mercados.
1	C	D	C
4	D	D	T
5	E	F	Sm
2	F	F	C
4	F	F	T

En donde:

T: Tiendona.

F: Queso fresco.

C: Central

D: Queso duro blando.

Sm: San Miguelito.

**Nota:** las letras del orden del muestreo se usaron de la siguiente manera:

De las letras A y B son del primer muestreo.

De las letras C y D son del segundo muestreo.

De las letras E y F son del tercer muestreo.

Los números de los puestos se usaron de la siguiente forma:

Los números 1, 2 y 3 son los puestos del mercado Central.

El número 4 son los puestos del mercado la Tiendona.

El número 5 son los puestos del mercado San Miguelito.

## ANEXO N° 8

### Medios y Reactivos

#### MEDIOS DE CULTIVO <sup>(28)</sup>.

- Caldo de enriquecimiento para *listeria*
- Agar selectivo base para *listeria* OXFORD
- Agar selectivo base para *listeria* PALCAM.
- Agar Tripticasa soya
- Extracto de levadura
- Caldo rojo de metilo-voges-proskauer.
- Agua de triptona (indol)
- Triple azúcar de hierro (TSI)
- Medio sim (movilidad)
- Agar base sangre.
- Caldo de Tripticasa soya.

#### REACTIVOS <sup>(28)</sup>.

- $\alpha$  - naftol
- Hidróxido de potasio
- Kovac
- Rojo de metilo
- Peroxido de Hidrogeno.
- Agua desmineralizada.
- Cristal Violeta.
- Lugol.
- Alcochol.
- Safranina.

## ANEXO N° 9

### REGISTROS DE LA TEMPERATURA DE LA REFRIGERADORA

Cuadro N° 25 Control de temperatura de la refrigeradora

Fecha	Temperatura
05 - 07 - 2013	3.9
06 - 07 - 2013	4.0
07 - 07 - 2013	3.8
08 - 07 - 2013	4.0
10 - 07 - 2013	4.0
12 - 07 - 2013	3.9
13 - 07 - 2013	4.0
16 - 07 - 2013	3.9
17 - 07 - 2013	4.0
19 - 07 - 2013	4.0
23 - 07 - 2013	4.0
24 - 07 - 2013	4.0
27 - 07 - 2013	3.9
08 - 08 - 2013	3.7
13 - 08 - 2013	4.0
14 - 08 - 2013	4.0
15 - 08 - 2013	4.0
16 - 08 - 2013	3.9
20 - 08 - 2013	4.0

Fecha	Temperatura
02-10-2013	4.0
03-10-2013	4.0
04-10-2013	3.8
07-10-2013	4.0
09-10-2013	4.0
14-10-2013	3.9
15-10-2013	3.9
16-10-2013	4.0
21-10-2013	3.8
22-10-2013	3.9
23-10-2013	4.0
24-10-2013	4.0
25-10-2013	3.9
28-10-2013	4.0
29-10-2013	4.0
01-11-2013	3.9
04-11-2013	3.9
05-11-2013	4.0
06-11-2013	4.0

Fecha	Temperatura
07-11-2013	4.0
08-11-2013	3.9
11-11-2013	4.0
12-11-2013	4.0
13-11-2013	3.9
14-11-2013	4.0
15-11-2013	4.0
18-11-2013	3.8
19-11-2013	4.0
20-11-2013	3.9
21-11-2013	4.0
22-11-2013	4.0
25-11-2013	3.9
26-11-2013	4.0
27-11-2013	4.0
28-11-2013	3.9
02-12-2013	3.9
03-12-2013	4.0

**ANEXO N° 10**

**PROCEDIMIENTO ENUMERACION *LISTERIA MONOCYTOGENES*<sub>(12,25)</sub>**



## ANEXO N° 10

### PROCEDIMIENTO ENUMERACIÓN *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN ALIMENTOS ISO 11290-2. MODIFICADO <sup>(12,25)</sup>.

Inoculación e incubación:

- Transferir con pipeta estéril 0,1 mL de la suspensión inicial a dos placas de agar ALOA (placas previamente secadas en incubadora).
- Repetir este procedimiento usando diluciones decimales consecutivas si es necesario.
- Cuando para ciertos productos es necesario estimar bajos números de *L. monocytogenes*, el límite de enumeración puede ser reducido por un factor de 10 examinando 1,0 mL de la suspensión inicial. Distribuya el inóculo de 1 mL sobre la superficie del agar en una placa de Petri grande (140 mm) o sobre la superficie del agar en placa de Petri pequeña (90 mm) pero en 3 porciones y disemine con rastrillo estéril. En ambos casos debe preparar duplicados de siembra usando 2 placas de 140 mm ó 6 en el caso de usar placas de 90 mm.
- Cuidadosamente esparcir o diseminar el inóculo lo más pronto posible sobre la superficie del agar sin tocar los bordes de la placa con el rastrillo. Utilice un rastrillo estéril por cada placa.
- Dejar las placas cerradas a temperatura ambiente por 15 minutos para que el inóculo sea absorbido en el agar.
- Invertir las placas y colocar en la incubadora a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 24 h y una incubación adicional de 18 a 24 h.
- Incubar las placas de agar ALOA en condiciones aeróbicas.

#### Enumeración:

- Después de la incubación por 24 horas si el desarrollo de las colonias es leve o no se observa desarrollo realizar una incubación adicional de 18 h a 24 h  $\pm$  3 horas
- Las colonias de *L. monocytogenes* son azul-verdosa con un halo opaco. Las colonias de *Listeria spp* son azul- verdosas sin halo.
- Contar todas las colonias presuntivas o sospechosas de *Listeria spp* en cada placa que contiene menos de 150 de colonias características y no características.

#### Confirmación de *listeria spp*

#### Selección de colonias para confirmación:

- Después del período de incubación conservar las placas que contienen menos de 150 colonias presuntivas de *Listeria spp*, de todas las diluciones y si es posible de dos diluciones sucesivas.
- Seleccionar 5 de las colonias presuntivas o sospechosas de cada placa retenida. Si en la placa hay menos de 5 colonias presuntivas seleccione para confirmación todas las existentes.
- Traspasar y sembrar por aislamiento las colonias seleccionadas sobre la superficie seca de agar soya triptona extracto de levadura (TSYEA), de manera que se obtengan colonias bien aisladas.
- Incubar las placas sembradas a 35 a 37 °C  $\pm$  1°C por 18 a 24 horas o hasta que el desarrollo sea satisfactorio.
- Las colonias típicas son de 1 mm a 2 mm de diámetro, convexas, sin color y opacas con bordes regulares o enteros.
- Realizar las pruebas confirmativas a partir de cultivo puro en agar TSYEA.