

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**PROPUESTA DE UN MANUAL DE TECNICAS MICROBIOLÓGICAS PARA  
LOS DIFERENTES GRUPOS ALIMENTICIOS, REFERENCIADOS EN LAS  
METODOLOGIAS NORMALIZADAS DE LA ADMINISTRACION DE DROGAS  
Y ALIMENTOS (FDA).**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR  
WALKER JAVIER RAMIREZ AMAYA**

**PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA**

**SEPTIEMBRE 2012**

**SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

**SECRETARIA GENERAL**

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANA**

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

**SECRETARIO**

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

**COORDINADORA GENERAL**

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

**ASESORAS DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS MICROBIOLOGICO**

MSc. Coralia de Los Ángeles González de Díaz

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

**DOCENTE DIRECTORA**

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos

## DEDICATORIA

La presente tesis es el resultado de un gran esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dándome ánimo, acompañándome en los momentos más difíciles y en los momentos de felicidad.

Primeramente agradezco a Dios todopoderoso por haberme dado la sabiduría y el entendimiento para poder llegar al final de mi carrera, por proveerme de todo lo necesario para salir adelante.

A mis padres mil gracias por el apoyo incondicional que me brindaron por todos los sacrificios que hicieron a lo largo de mi carrera, así como su comprensión y paciencia en momentos difíciles.

Agradezco a toda mi familia ya que estuvieron apoyándome a lo largo de mi carrera y dándome fuerzas para salir adelante.

Quiero expresar mi agradecimiento a mi docente director de tesis, MSc. Evelyn de Ramos por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo.

Un cordial agradecimiento al Comité de trabajos de graduación: Lic. Odette Rauda, MSc. Coralia González y MSc. Amy Moran por sus valiosas sugerencias.

Debo un especial reconocimiento a la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, la cual me acogió y me formo como un profesional

durante largos y fructíferos periodos, gracias por toda la enseñanza que me brindo.

A ti Josabel, que desde el principio hasta el día hoy, tu amor y confianza en mí me han dado la fuerza que me ayuda a seguir adelante, que me reanima cuando estoy débil y me levanta para seguir luchando día con día.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

Gracias a todos.

Walker Javier Ramírez

## INDICE

	<b>Página</b>
Resumen	
CAPITULO I	
I. Introducción	xiii
CAPITULO II	
2.0 Objetivos	16
2.1 Objetivo General	16
2.2 Objetivos Específicos	16
CAPITULO III	
3.0 Marco teórico	18
3.1 Plan de muestreo	25
3.1.1 Tipos de planes de muestreos	26
3.1.1.1 Plan de muestreo de 2 clases	26
3.1.1.2 Plan de muestreo de 3 clases	26
3.2 Clasificación de alimentos por riesgo	27
3.2.1 Alimento riesgo tipo A	27
3.2.2 Alimento riesgo tipo B	28
3.2.3 Alimento riesgo tipo C	28
3.3 Factores de riesgo	28
CAPITULO IV	
4.0 Diseño Metodológico	32
4.1 Tipo de estudio	32

	<b>Página</b>
4.2 Investigación bibliográfica	32
4.3 Partes con las que cuenta el manual	32
<b>MANUAL DE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS</b>	
Portada	
Índice	
Índice de Figuras	
Índice de Cuadros	
Índice de Tablas	
Siglas y Abreviaturas	
Introducción	12
Grupos de Alimentos de acuerdo al origen y/o tecnología aplicada en su elaboración	15
Metodologías Analíticas	25
Recepción de muestra	156
Criterios Microbiológicos	158
Formularios de Calidad	172
<b>CAPITULO V</b>	
5.0 Resultados y Discusión de Resultados	221
<b>CAPITULO VI</b>	
6.0 Conclusiones	225
<b>CAPITULO VII</b>	
7.0 Recomendaciones	228
Bibliografía	
Glosario	

## INDICE DE TABLAS

	Tabla	Página
Tabla N° 1	Categorías de riesgo asociadas al alimento y al microorganismo	29

## **RESUMEN**

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue proponer un manual de técnicas microbiológicas para los diferentes grupos alimenticios, las cuales son referenciadas en las metodologías normalizadas de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA).

Se realizó una investigación bibliográfica basada en las metodologías del Manual Analítico Bacteriológico (BAM) para la elaboración del manual.

El presente manual identifica y describe las diferentes matrices alimentarias según el grupo al que pertenecen de acuerdo al origen y/o tecnología aplicada en su elaboración, según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08.

Además se describen detalladamente cada una de las técnicas analíticas aplicadas a los diferentes grupos alimenticios según las metodologías oficiales del Manual Analítico Bacteriológico establecidas por la Administración de Drogas y Alimentos FDA para los siguientes microorganismos: ***Listeria monocytogenes***; mohos y levaduras; ***Escherichia coli***, bacterias coliformes y Enterobacterias; ***Escherichia coli*** O157:H7; ***Salmonella spp***; ***Staphylococcus aureus***; bacterias mesófilas aeróbicas; ***Bacillus cereus***; ***Clostridium perfringens***; ***Vibrio cholerae*** O1 y ***Vibrio parahaemolyticus***. Para la determinación de ***Enterobacter sakazakii*** se recopiló una metodología no oficial de un informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO.

Los criterios microbiológicos que se aplican para las diferentes matrices alimentarias fueron retomados del Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08.

Se describen los formularios de control de calidad que acompañan a las metodologías aplicadas para las diferentes matrices alimentarias. Para de esta forma recopilar la información de la muestra de alimento analizada.

Las técnicas de análisis microbiológico de alimentos, referenciadas en las metodologías normalizadas de la administración de drogas y alimentos (FDA), presentan variaciones dependiendo de los diferentes grupos alimenticios o tipo de alimento por analizar.

El manual constituye una herramienta cuya finalidad es la de facilitar el desarrollo de los análisis microbiológicos de los diferentes grupos de alimentos, debido a que proporciona metodologías analíticas oficiales y no oficiales, en las cuales se han simplificado las diferentes actividades que intervienen en el proceso de análisis, para así obtener resultados confiables y seguros.

Las metodologías analíticas deben validarse antes de su aplicación, esto con el objetivo de obtener resultados precisos y confiables.

Se recomienda emplear este manual como una guía de consulta para docentes y estudiantes.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 INTRODUCCION

El derecho de cada persona de tener acceso a una alimentación nutritiva y sana, se cita en la Declaración Universal de los Derechos Humanos de 1948, confirmada en la Cumbre Mundial sobre la Alimentación de 1996 y se le denomina: El Derecho a los Alimentos.

La Cumbre Mundial define Alimentación adecuada a la calidad y cantidad necesaria de alimento para lograr una vida activa y saludable.

La inocuidad alimentaria es el resultado de un proceso que asegura la calidad en la producción y elaboración de los productos, garantizando la obtención de alimentos sanos, nutritivos y libres de peligro para la población.

Para lograr un producto inocuo, debe de producirse bajo un sistema de Buenas Prácticas de Elaboración (BPE) y apoyarse en análisis que estudien los niveles o la presencia de estos en sus materias primas o en el alimento procesado. Dentro de los análisis que deben realizarse esta el Microbiológico. El cual tiene dos finalidades: (1) comprobar la calidad de las Buenas Prácticas de Elaboración (BPE) y (2) la comprobación de la calidad aceptable de los alimentos en el mercado nacional e internacional. La principal actividad del análisis microbiológico de alimentos es el control, dirigido a evitar el consumo de productos elaborados en condiciones deficientes y que sean potencialmente peligrosos para la salud de los consumidores.

Para garantizar la inocuidad, el sector industrial debe abocarse a los laboratorios dedicados al control de calidad microbiológico y estos, a su vez, deben de apoyarse en metodologías analíticas normalizadas, con el fin de garantizar la calidad de los resultados.

El objetivo perseguido en el presente estudio, fué proveer un Manual de Técnicas Analíticas para el Control Microbiológico de los principales grupos alimenticios, con metodologías analíticas Normalizadas del Bacteriological Analytical Manual *On Line* (BAM) de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), con procedimientos apropiados, según la normativa que cada grupo de alimento requiera, para regular la calidad o inocuidad del mismo, relacionándolo con los planes de muestreo para cada caso.

En el presente manual se incluyeron diferentes metodologías (oficiales y no oficiales) para el análisis microbiológico de las diferentes matrices alimentarias. Se recopilaron metodologías oficiales basadas en el BAM para los siguientes microorganismos: ***L. monocytogenes***; mohos y levaduras; ***E. coli***, bacterias coliformes y Enterobacterias; ***E. coli*** O157:H7; ***Salmonella spp***; ***S. aureus***; bacterias mesófilas aeróbicas; ***B. cereus***; ***C. perfringens***; ***V. cholerae*** O1 y ***V. parahaemolyticus***. También se recopiló una metodología no oficial de un informe de la FAO, para la determinación de ***E. sakazakii***.

Adicional a las técnicas, se diseñaron formularios de calidad para cada metodología, para la trazabilidad de las muestras y aseguramiento de la calidad.

Dicho trabajo se llevó a cabo en las bibliotecas de: Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social FUSADES, en un periodo de dos años.

**CAPITULO II**  
**OBJETIVOS**

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Proponer un manual de técnicas microbiológicas para los diferentes grupos alimenticios, referenciadas en las metodologías normalizadas de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

2.2.1 Identificar y describir las diferentes matrices alimenticias.

2.2.2 Describir cada una de las técnicas analíticas aplicadas a los diferentes grupos alimenticios.

2.2.3 Relacionar los criterios microbiológicos establecidos en las normativas (donde aplique) con respecto a los diferentes grupos alimenticios.

2.2.4 Describir los formularios de control de calidad que acompañen a las diferentes metodologías.

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

### 3.0 MARCO TEORICO

Un alimento se considera toda sustancia procesada, semiprocada o no procesada, que se destina a la ingesta humana incluidas las bebidas, goma de mascar y cuales quiera otra sustancia que se utilicen en la elaboración, preparación y tratamiento del mismo, pero no incluye los cosméticos, el tabaco ni las sustancias que se utilizan como medicamentos.

Existen ciertas clasificaciones de alimento, dentro de las cuales podemos enumerar:

- Alimento procesado: es aquel que ha sido sometido a un proceso tecnológico adecuado para su conservación y consumo posterior.
- Alimento semiprocado: es el que ha sido sometido a un proceso tecnológico adecuado para su conservación y que requiere de un tratamiento previo a su consumo ulterior (posterior).
- Alimento no procesado: es aquel que no ha sufrido modificaciones de origen físico, químico o biológico, salvo las indicadas por razones de higiene o por la separación de partes no comestibles.
- Alimento contaminado: es aquel que contiene cualquier agente biológico o químico, materia extraña u otras sustancias no añadidas intencionalmente y que pueden comprometer la inocuidad o la aptitud de los alimentos tomados.<sup>(2)</sup>

La Microbiología de los Alimentos, es la parte de la microbiología que trata de los procesos en que los microorganismos influyen en las características de los productos de consumo alimenticio humano o animal. La microbiología de

alimentos, por consiguiente, engloba aspectos de ecología microbiana y de biotecnología para la producción.<sup>(11)</sup>

La inocuidad en los alimentos, es la condición que garantiza que estos no causarán daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso que se destinan, además, es uno de los cuatro grupos básicos de características que junto con las nutricionales, las organolépticas y las comerciales componen la calidad de los alimentos.<sup>(2)</sup>

Hace 20 años, la inocuidad alimentaria era difícilmente una preocupación doméstica. Sin embargo, de acuerdo a los resultados de las últimas estadísticas, en los años 90 se reportó un alarmante porcentaje de enfermedades relacionadas con la inocuidad de los alimentos, los riesgos asociados con las pobres prácticas de manejo de los alimentos se han vuelto un asunto de gran preocupación, no solo para el público, también para aquellos en la industria de los alimentos que llevan la responsabilidad.<sup>(15)</sup>

Según datos proporcionados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, en el presente año, se estaría sobrepasando los 925 millones de personas con hambre en el mundo, habiendo aumentado en 75 millones, entre el 2007 y el 2008.

La carencia de los alimentos básicos a nivel mundial es evidente, adicional a esto, el aumento de precios y que los mismos están siendo utilizados para la elaboración de biocombustibles. Todo esto ha provocado que los suministros sean deficientes para poder alimentar a la población mundial.

Las enfermedades resultan una importante carga para la salud, millones de personas enferman y muchas mueren a causa de consumir alimentos insalubres.

La inocuidad de los alimentos engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Las políticas y actividades que persiguen dicho fin deberán de abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción hasta llegar al consumo.<sup>(6)</sup>

Las nuevas concepciones de seguridad alimentaria tienden a incorporar el acceso a los alimentos, su Inocuidad y los factores nutricionales.

Los temas relacionados con la higiene de los alimentos, han conformado la base de la denominada Seguridad o Inocuidad Alimentaria.

De acuerdo a la definición aprobada por la Cumbre Mundial sobre la Alimentación organizada por la FAO en junio del año 2002, define a la Seguridad Alimentaria al acceso físico y económico a la cantidad idónea de alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias a fin de llevar una vida activa y sana. La seguridad alimentaria se logra cuando se ha garantizado la disponibilidad de alimentos, suministros estable e inocuo y cada persona los tiene a su alcance.

Desde entonces, se han presentado varios sucesos que han modificado la perspectiva de la seguridad de los alimentos, en especial en los países desarrollados. En estos lugares el acceso a los mismos está relativamente asegurado; es de mencionar que la cantidad y la calidad de ellos no representan que sean completamente inocuos.

La preponderancia de cada una de las dimensiones mencionadas varía en función del área geográfica referida. Es así que para los países europeos, en general, la dimensión que actualmente cobra mayor prevalencia es todo lo relacionado con la calidad de los alimentos.

Según las estimaciones, un valor promedio para una existencia saludable se sitúa en torno a las 2.700 calorías por día. Se considera hoy, que para la subsistencia, el mínimo necesario es de 1.500 calorías por día, lo que mantiene al ser humano en estado de hambre crónica.

Según el informe de la FAO, unos 852 millones de personas a nivel mundial padecen hambre crónica y malnutrición, a causa de su situación de miseria. La calidad es un concepto que viene determinado por la conjunción de distintos factores relacionados todos ellos con la aceptabilidad del alimento.

Pudiendo ser la calidad, el conjunto de atributos que hacen referencia de una parte a la presentación, composición y pureza, tratamiento tecnológico y conservación que hacen del alimento algo más o menos apetecible al consumidor y por otra parte al aspecto sanitario y valor nutritivo del alimento.

En la práctica es preciso indicar la calidad a la que nos referimos:

- Calidad nutritiva
- Calidad sanitaria
- Calidad tecnológica
- Calidad organoléptica
- Calidad económica

Son determinantes de la calidad:

- Color
- Olor
- Aroma
- Sabor
- Textura
- Ausencia de contaminantes (bacterias, etc.)

Existe posibilidad de confusión en el empleo de este concepto: "alimentos caros son de buena calidad". Calidad debe significar idoneidad con un patrón de atributos establecido.

Para poder garantizar la calidad y la buena elaboración de un alimento es necesario que este se analice de tal manera que se demuestre que este es inocuo y apto para el consumo humano.

Un producto tiene buena calidad microbiológica cuando sus cargas microbianas son reducidas y constantes (esto es, no presentan variaciones estacionales o de cualquier otro tipo de periodicidad que impiden que el producto sea homogéneo a lo largo del tiempo).

Para lograr un aumento de la calidad microbiológica de un alimento lo que hay que hacer es determinar en la industria cuáles son los puntos críticos del proceso y evitarlos siguiendo un código estricto de Buenas Prácticas de Elaboración y Distribución del alimento (BPE).

Por lo tanto, la prevención está en evitar manufacturar productos de baja calidad microbiológica y no en comprobar la calidad microbiológica de los ya

elaborados (lo que, por otra parte, presenta una relación coste - beneficio muy baja por la gran cantidad de muestras que es necesario analizar).<sup>(11)</sup>

En el desarrollo de las BPE se realizará un análisis del riesgo consistente en determinar el peligro para la salud humana de un factor patógeno presente en un alimento y el medio como puede reducirse ese riesgo hasta valores infinitesimales por medios tecnológicos. Este riesgo depende de la DMI (Dosis Mínima Infección) del microorganismo y de los valores del mismo que se encuentren en el alimento; así mismo hay que valorar la carga inicial de microorganismos en cada una de las raciones del alimento, y el número de raciones o partes consumidas por la población en un determinado tiempo.

Aplicando estas BPE, las oscilaciones en la calidad microbiológica del producto disminuyen y el análisis microbiológico es más consistente puesto que permite detectar alejamientos de las BPE y nos permite garantizar que los alimentos pueden ser consumidos sin que se presente algún tipo de intoxicación alimentaria.

La calidad incrementa el desarrollo y la diferenciación de los productos, favoreciendo el crecimiento de la competitividad. Responde a pautas técnicas que abarcan la gestión en todas las etapas de la cadena alimentaria (desde la obtención de la materia prima utilizada hasta el producto final elaborado).<sup>(10)</sup>

La presencia de bacterias no siempre se hace visible en los alimentos, no siempre presentan cambios de sabor, olor o, incluso, alteraciones en su aspecto. El objetivo de la higiene en este sentido es garantizar la producción y elaboración de alimentos que sean inocuos y limpios.

El Criterio microbiológico de inocuidad define la aceptabilidad de un producto o un lote de un alimento basado en la ausencia o presencia, o en la cantidad de microorganismos, por unidad o unidades de masa, volumen, superficie o lote y es aplicable a productos comercializados.

Un criterio microbiológico consta de:

- Una descripción de los microorganismos que suscitan preocupación y/o de sus toxinas/metabolitos y el motivo de dicha preocupación.
- Los métodos analíticos para su detección y/o cuantificación.
- Un plan que defina el número de muestras de campo que hay que tomar y la magnitud de la unidad analítica.
- Los límites microbiológicos que se consideran apropiados para el alimento en el punto o puntos especificados de la cadena alimentaria.
- El número de unidades analíticas que deben ajustarse a esos límites.

Un criterio microbiológico debe indicar también:

- El alimento al que se aplica el criterio.
- El punto o los puntos de la cadena alimentaria en que se aplica el criterio.
- Toda medida que deba adoptarse cuando no se cumple con dicho criterio.

Al aplicar un criterio microbiológico a la evaluación de los productos, para que puedan aprovecharse de la mejor manera posible el dinero y la mano de obra, es esencial que se apliquen solo ensayos apropiados a los alimentos y los puntos de la cadena alimentaria que ofrecen los mayores beneficios en relación con la posibilidad.<sup>(18)</sup>

Un parámetro microbiológico consiste en las determinaciones específicas practicadas a cada alimento, tales como, microorganismos indicadores, microorganismos patógenos, u otros que causen infección y enfermedad.

Los microorganismos indicadores o Indicador microbiológico, son microorganismos no patógenos frecuentemente asociados a patógenos, utilizados para reflejar el riesgo de la presencia de agentes causantes de enfermedades.

Límite máximo permitido es el valor del parámetro microbiológico máximo permitido en el alimento.

Los criterios microbiológicos pueden utilizarse para definir y comprobar que se cumpla con los requisitos microbiológicos.<sup>(2)</sup>

### **3.1 Plan de muestreo**

Todo plan de muestreo incluye un procedimiento de muestreo y los criterios decisorios que han de aplicarse al lote, basándose en el examen del número prescrito de unidades de la muestra y de las unidades analíticas subsiguientes del tamaño indicado en los métodos determinados. Un plan de muestreo adecuadamente diseñado define la probabilidad de detección de microorganismos en un lote, pero debe tenerse presente que ningún plan de

muestreo puede asegurar la ausencia de un determinado organismo. Los planes de muestreo deberán ser administrativa y económicamente factibles.<sup>(17)</sup>

Es el procedimiento en que se estipula el tamaño de la muestra y el criterio de aceptación o rechazo, basándose en los resultados de análisis.

### **3.1.1 Tipos de planes de muestreos:**

3.1.1.1 Plan de muestreo de 2 clases: plan de muestreo por atributos, donde de acuerdo con los criterios microbiológicos puede dividirse en dos grados, “aceptable y no aceptable”, comprobando la presencia o ausencia de microorganismos, o si el límite microbiológico es superior o inferior a un nivel crítico establecido. Un plan de 2 clases queda descrito por  $n$  y  $c$ .

3.1.1.2 Plan de muestreo de 3 clases: un plan de muestreo por atributos, donde de acuerdo con los criterios microbiológicos puede dividirse en tres grados, “aceptable, “medianamente aceptable” y “no aceptable”. La clase aceptable tiene como límites  $m$ , la clase medianamente aceptable tiene como límites  $m$  y  $M$ , y la no aceptable aquellos valores superiores a  $M$ . Un plan de 3 clases queda descrito por  $n$ ,  $m$ ,  $M$  y  $c$ .

El registro sanitario es un procedimiento establecido, por el cual los alimentos procesados son aprobados por la autoridad sanitaria de cada Estado Parte para su comercialización.

La Vigilancia Sanitaria es la permanente y sistemática evaluación de las condiciones sanitarias de los alimentos ejercida por la autoridad sanitaria competente de cada Estado Parte con el objeto principal de proteger la salud de la población.

## Símbolos y abreviaturas

n = Número de unidades de muestras a ser analizadas.

m = Criterio microbiológico por debajo del cual el alimento no representa un riesgo para la salud.

c = Número máximo de unidades de muestra que puede contener un número de microorganismos comprendidos entre m y M para que el alimento sea aceptable.

M = Criterio microbiológico por encima del cual el alimento representa un riesgo para la salud.

NMP= Número más probable.

spp= Subespecies de un género de microorganismos.

UFC= Unidades formadoras de colonias.

## **3.2 CLASIFICACIÓN DE LOS ALIMENTOS POR RIESGO**

Para registro y vigilancia sanitaria se clasifican los alimentos basándose en la probabilidad de causar daño a la salud, la gravedad de dicho efecto y los factores de riesgo, de la siguiente manera:

3.2.1 Alimento 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.

3.2.2 Alimento Riesgo tipo B: Comprende los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tienen una mediana probabilidad de causar daño a la salud.

3.2.3 Alimento Riesgo tipo C: Comprende los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tienen una baja probabilidad de causar daño a la salud.

### **3.3 Factores de riesgo**

Los factores de riesgo que presentan las categorías de alimentos, dependen de:

- Características intrínsecas, tales como: composición, pH, acidez, actividad de agua.
- Proceso de elaboración.
- La población a quien va dirigido.
- La presentación del alimento.
- La forma de prepararlo.
- Las condiciones de almacenamiento y conservación.

De acuerdo a la clase de peligro determinado por las variables antes señaladas y por aquellas relacionadas a las condiciones de manipulación y consumo, se establecen las siguientes categorías de riesgo asociadas al alimento y al microorganismo:

Tabla N° 1. Categorías de riesgo asociadas al alimento y al microorganismo

Clase de peligro	Condiciones normales en las que se supone será manipulado y consumido el alimento tras el muestreo		
	Grado de peligrosidad reducido	Sin cambio de peligrosidad	Aumenta la peligrosidad
Sin peligro directo para la salud (contaminación general, vida útil y alteración)	Categoría 13 clases n=5 c=3	Categoría 2 3 clases n=5 c=2	Categoría 3 3 clases n=5 c=1
Peligro para la salud bajo, Indirecto	Categoría 4 3 clases n=5 c=3	Categoría 5 3 clases n=5 c=2	Categoría 6 3 clases n=5 c=1
Moderado, directo, difusión limitada	Categoría 7 3 clases n=5 c=2	Categoría 8 3 clases n=5 c=1	Categoría 9 3 clases n=5 c=1
Grave, directo directo, difusión potencialmente extensa	Categoría 10 2 clases n=5 c=0	Categoría 10 2 clases n=5 c=0	Categoría 10 2 clases n=5 c=0

Las categorías 1, 2 y 3 se aplican a aquellos microorganismos que tiene por objeto definir la vida útil y alteración del producto como recuento de microorganismos aerobios mesófilos, mohos y levaduras, *Lactobacillus*, entre otros de la siguiente manera:

- Categoría 1: plan de 3 clases, donde n=5 y c= 3
- Categoría 2: plan de 3 clases, donde n=5 y c= 2
- Categoría 3: plan de 3 clases, donde n=5 y c= 1

Las categorías 4, 5 y 6 se usan para microorganismos indicadores tales como coliformes totales, **Enterobacteriáceas**, entre otros, de la siguiente manera:

- Categoría 4: plan de 3 clases, donde  $n=5$  y  $c= 3$ .
- Categoría 5: plan de 3 clases, donde  $n=5$  y  $c= 2$ .
- Categoría 6: plan de 3 clases, donde  $n=5$  y  $c= 1$ .

Las categorías de alimentos 7, 8 y 9 se usan en parámetros microbiológicos que siendo considerados patógenos, en bajos niveles pueden aceptarse, tales como **Staphylococcus aureus**, **Bacillus cereus**. De la siguiente manera:

- Categoría 7: plan de 3 clases, donde  $n=5$  y  $c= 2$ .
- Categoría 8: plan de 3 clases, donde  $n=5$  y  $c= 1$ .
- Categoría 9: plan de 3 clases, donde  $n=5$  y  $c= 1$ .

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

- Categoría 10: plan de 2 clases, donde  $n= 5$  y  $c= 0$ . <sup>(2)</sup>

**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLOGICO**

## **4.0 DISEÑO METODOLOGICO**

### **4.1 Tipo de estudio:**

Bibliográfico: el estudio se desarrolló a través de un enfoque teórico; donde se consultaron: tesis, libros y documentos electrónicos de donde se recopilaron algunas metodologías normalizadas del FDA así como metodologías no oficiales con la finalidad de sustentar teóricamente el documento de investigación.

### **4.2 Investigación bibliográfica**

Se realizó en las bibliotecas de:

-Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

-Biblioteca del Laboratorio de la Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social FUSADES.

-Internet

### **4.3 Partes con las que cuenta el manual:**

Portada

Índice

I. Introducción

II. Descripción de las diferentes matrices alimentarias.

### III. Técnicas analíticas para cada grupo de alimento

-Encabezado

-1. Objetivo

-2. Alcance

-3. Descripción y resumen del método

-4. Materiales y equipo

-5. Reactivos y medios de cultivo

-6. Procedimiento

-7. Formulario

### IV. Glosario

The background features a large, faded seal of the University of El Salvador. The seal is oval-shaped with a central figure of a woman holding a child. The text "UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR" is written along the top inner edge, and "CENTRO AMERICANO" is written along the bottom inner edge. A ribbon at the bottom contains the date "1827".

**MANUAL  
DE  
TÉCNICAS  
MICROBIOLÓGICAS**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**MANUAL DE TECNICAS MICROBIOLÓGICAS PARA LOS DIFERENTES  
GRUPOS ALIMENTICIOS, REFERENCIADOS EN LAS METODOLOGIAS  
NORMALIZADAS DE LA ADMINISTRACION DE DROGAS Y ALIMENTOS  
(FDA).**

**SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA**

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b>	
	DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y CONTAMINACIÓN AMBIENTAL <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Código:
MANUAL DE MICROBIOLOGIA ALIMENTARIA		Nº de página: Versión: Fecha:
Elaborado por:		Fecha:
Revisado por:		Fecha:
Aprobado por:		Fecha:

## INDICE

Contenido	Página
Introducción	12
Grupos de alimentos de acuerdo al origen y/o tecnología aplicada en su elaboración	15
<b>METODOLOGÍAS ANALÍTICAS</b>	
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	24
Enumeración de Mohos y Levaduras	38
Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	43
- Método del numero más probable (NMP).	47
- Método sólido (UFC).	55
Determinación <i>Escherichia coli</i> O157:H7	66
Determinación de <i>Salmonella spp</i>	78
- Prueba serológica	98
Enumeración de <i>Staphylococcus aureus</i>	101
Conteo total de bacterias aeróbicas en alimentos y bebidas	109
Enumeración de <i>Bacillus cereus</i>	114
Enumeración de <i>Clostridium perfringens</i>	126
Determinación de <i>Enterobacter sakazakii</i>	134
Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> 01 y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	139
Recepción de muestras	156
Criterios microbiológicos	158
Formularios de calidad	172

## INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Página
1	Esquema de trabajo de <i>Listeria monocytogenes</i>	34
2	Colonias características de <i>Listeria spp</i> en Palcam	35
3	Prueba de catalasa positiva	35
4	Hemolisis en agar sangre	35
5	Prueba de movilidad para <i>Listeria spp</i>	36
6	Prueba de CAMP	36
7	Esquema de enumeración de mohos y levaduras	41
8	Esquema de la fase presuntiva de Determinación <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes	57
9	Controles positivos y negativos de tubos con LST	58
10	Esquema de la fase confirmativa para bacterias Coliformes totales	59
11	Esquema de la fase confirmativa para coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i>	60
12	Esquema de la fase presuntiva para la determinación de <i>Escherichia coli</i>	61
13	Esquema de la fase confirmativa para la determinación de <i>Escherichia coli</i>	62
14	Esquema para la cuantificación de Enterobacterias	64
15	Esquema para la Determinación <i>Escherichia coli</i> O157:H7	71
16	Colonias características de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	75
17	Reacción característica de X-gal para coliformes	76
18	Prueba de MUG positiva y negativa	76
19	Prueba de Indol Reacción positiva	77

Figura N°		Página
20	Prueba de látex	77
21	Esquema para la Determinación de <b><i>Salmonella spp</i></b>	95
22	Colonias características de <b><i>Salmonella spp</i></b> en medios XLD, BS y HE	96
23	Reacción típica de <b><i>Salmonella spp</i></b> en TSI y LIA	97
24	Preparaciones previas para la prueba serológica de <b><i>Salmonella spp</i></b>	99
25	Prueba serológica para <b><i>Salmonella spp</i></b>	100
26	Esquema para la Enumeración de <b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	106
27	Colonias características de <b><i>Staphylococcus aureus</i></b> en Agar Baird-Parker	107
28	Control positivo y control negativo de prueba de coagulasa	108
29	Control positivo y negativo de prueba de la catalasa	108
30	Morfología microscópica de <b><i>Staphylococcus aureus</i></b> (Tinción de Gram)	108
31	Esquema para la cuantificación de bacterias aeróbicas	113
32	Esquema para la Enumeración de <b><i>Bacillus cereus</i></b>	121
33	Esquema para la Enumeración de <b><i>Clostridium perfringens</i></b>	132
34	Esquema para la Determinación de <b><i>Enterobacter sakazakii</i></b>	137
35	Esquema para la Determinación de <b><i>V. cholerae O1</i></b>	151
36	Esquema para la Identificación de <b><i>Vibrio parahaemolyticus</i></b> en mariscos	152
37	Colonias características de <b><i>V. cholerae</i></b> en Agar TCBS	155

## INDICE DE CUADROS

Cuadro N°		Página
1	Cuadro de diferenciación de especies de <b>Listeria</b>	37
2	Prueba hemolítica CAMP para diferentes especies de <b>Listeria</b>	37
3	Reacciones bioquímicas típicas de <b>Salmonella spp</b>	97
4	Características Diferenciales de las Especies del Grupo <b>Bacillus cereus</b>	125
5	Resumen de pruebas para <b>Clostridium perfringens</b>	133

## INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Página
1	Ejemplo del uso de tabla del NMP	53
2	NMP por gramo 95% de confianza por 3 tubos de cada uno de 0,1, 0,01 y 0,001 g de inóculos	65

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

ACV: Suplemento Acriflavina Cefsulodina Vancomicina

AGS: Agar inclinado Arginina Glucosa

AN: Agar Nutritivo

AP: Agua Peptonada

API 20 E: Galería de aplicación rápida para Enterobacterias

API 20 NE: Galería de aplicación rápida para No Enterobacterias

APW: Agua Peptonada Alcalina

ATCC: American Type Culture Collection

B/A: Básico/ Acido

B/B: Básico/ Básico

BAM: Manual Analítico Bacteriológico

***B. antracis: Bacillus antracis***

***B. cereus: Bacillus cereus***

BGLB: Caldo Verde Brillante Bilis Lactosa

BHI: Brain Heart Infusion

***B. mycoides: Bacillus mycoides***

BPA: Agar Baird Parker

BPE: Buenas Prácticas de Elaboración del alimento.

BS: Agar Bismuto Sulfito

***B. thuringiensis: Bacillus thuringiensis***

c= Número máximo de unidades de muestra que puede contener un numero de microorganismos comprendidos entre m y M para que un alimento sea aceptable.

CAMP: Christie Atkins Munch Peterson

CC: Discos Colicomplete

CEL: Caldo de Preenriquecimiento para ***Listeria***

CF: Coliformes Fecales

CL: Conteo de Levaduras

CM: Conteo de Mohos

CML: Conteo de Mohos y Levaduras

**C. perfringens: Clostridium perfringens**

CT: Coliformes totales

CTS: Caldo Triptico de Soya

DG18: Agar Dicloran Glicerol 18%

DMI: Dosis Minima Infeccion

**EC: Escherichia coli**

ECEH: **Escherichia coli** Entero Hemorrágica

EC-MUG: Caldo **Escherichia coli** con 4- metil-β- umbeliferil-D- glucuronido

**E. coli: Escherichia coli**

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EE: Caldo de Enriquecimiento de Enterobacterias

EN: Enterobacterias

**E. sakazakii: Enterobacter sakazakii**

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

FDA: Administración de Drogas y Alimentos

FUSADES: Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social

G+: Gram positivo

G-: Gram negativo

H: Antígeno flagelar

HCl: Acido Clorhídrico

HE: Agar Hektoen Entérico

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrogeno

H<sub>2</sub>S: Sulfuro de Hidrogeno

ICC: Infusión Cerebro Corazón

IMVIC: Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer y Citrato

K: Antígeno Capsular

KOH: Hidróxido de Potasio

K<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>: Sulfito de Potasio

L-EMB: Agar de Levine Eosina Azul de Metileno.

LIA: Agar Lisina Hierro

***L. innocua: Listeria innocua***

***L. ivanovii: Listeria ivanovii***

***L. monocytogenes: Listeria monocytogenes***

***L. murrayi: Listeria murrayi***

LPM: Agar Cloruro de Litio Feniletanol Moxolactam

***L. seeligeri: Listeria seeligeri***

LST: Caldo Lauril Triptosa

***L. welshimeri: Listeria welshimeri***

m= Criterio microbiológico por debajo del cual el alimento no representa un riesgo para la salud

M= Criterio microbiológico por encima del cual el alimento no representa un riesgo para la salud.

mBPWp: Agua Peptonada Tamponada Modificada con Piruvato

MINSAL: Ministerio de Salud

MIO: Movilidad Indol Ornitina

ML: Mohos y Levaduras

MR: Rojo de Metilo

MR-VP: Caldo Rojo de Metilo- Voges Proskauer

MTM: Medio de Prueba de la Motilidad

MUG: 4- metil-β- umbeliferil-D- glucuronidasa

MYP: Agar Manitol Yema de Huevo- Polimixina

n= Número de unidades de muestras a ser analizadas.

NaCl: Cloruro de Sodio

NaOH: Hidróxido de Sodio

NMP: Numero Más Probable

O: Antígeno Somático

OSARTEC: Organismo Salvadoreño de Reglamentación Técnica

OXA: Agar Oxford

PBS: Buffer fosfato Salino

PCA: Plate Count Agar

PDA: Agar Papa Dextrosa

P/V: Peso/ Volumen

***R. equi: Rhodococcus equi***

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano

RV: Rappaport Vassiliadis

***S. aureus: Staphylococcus aureus***

SC: Caldo Selenito Cisteína

SDS: Sulfato de Sodio Dodecilico

SFP: ***Clostridium perfringens*** Agar Base

spp: subespecies de un género de microorganismos

TCBS: Agar Tiosulfato Citrato Sales Biliares Sacarosa

TC-SMAC: Agar Telurito Cefixima- Agar MacConkey mas Sorbitol

TDH: Hemolisina Directa Termoestable

T1N1 y T1N3: Triptona 1% y Cloruro de Sodio 1% o 3%

TSA: Agar Triptico de Soya

TSA+EY: Agar Tripticasa de Soya con Extracto de Levadura

TSB: Caldo Triptico de Soya

TSB+EY: Caldo Tripticasa de Soya con Extracto de levadura

TSI: Agar Triple Azúcar Hierro

TT: Tetracionato

UHT: Ultra-High Temperature (ultra pasteurización)

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

UV: Ultravioleta

***V. cholerae: Vibrio cholerae***

VP: Voges Proskauer

***V. parahaemolyticus: Vibrio parahaemolyticus***

VRBA: Agar Rojo Violeta Bilis

VRBG: Agar Rojo Violeta Bilis Glucosa

X-Gal: X- Galactosidasa

XLD: Agar Xilosa Lisina Desoxicolato

## **INTRODUCCION**

## INTRODUCCION

El manual de procedimientos es una recopilación en forma de texto, esquemas, fotografías en una forma minuciosa y detalla todas las instrucciones que se deben seguir para realizar una determinada metodología analítica, de una manera sencilla para que sea fácil de entender.

En el presente manual se identifican y se describen los diferentes grupos de alimentos de acuerdo al origen y/o tecnología aplicada en su elaboración, según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08.

Cada una de las metodologías analíticas que se encuentran en el manual consta de: su respectivo encabezado en el cual se identifica la metodología a la cual pertenece, objetivo, alcance, descripción y resumen del método, materiales y equipo, reactivos y medios de cultivo y procedimiento.

Para la descripción de las metodologías analíticas de alimentos se utilizó el Manual Analítico Microbiológico BAM. Del cual se recopiló las metodologías oficiales para: detección de *Listeria monocytogenes*; enumeración de mohos y levaduras (Técnica de Siembra directa y dilución en placa); determinación y enumeración de *Escherichia coli*, bacterias coliformes y Enterobacterias (Método sólido UFC/ g o ml y Método del Número Más Probable NMP); determinación *Escherichia coli* O157:H7 (Método de estrías); determinación de *Salmonella spp* (Método de estrías, pruebas bioquímicas en TSI, LIA, medio movilidad, prueba serológica polivalente flagelar (H)); enumeración de *Staphylococcus aureus* (Método de conteo directo en placa, Prueba de coagulasa, Prueba de catalasa, Tinción al Gram); Conteo total de bacterias aeróbicas (Vertido en placa); enumeración de *Bacillus cereus* (Siembra en superficie, Confirmación (tinción al Gram), Pruebas de: movilidad, crecimiento

rizoide y cristales de proteína toxica); enumeración de ***Clostridium perfringens*** (Vertido en placa, Prueba presuntiva de confirmación, Prueba Hierro-leche, Prueba de confirmación); Determinación de ***Vibrio cholerae*** O1(Método de estrías, Pruebas bioquímicas API 20 NE, Arginina-glucosa, Tolerancia a la sal, Prueba del hilo, Reacción oxidasa, Prueba serológica de aglutinación) y ***Vibrio parahaemolyticus*** ( Método NMP, Pruebas bioquímicas API 20 NE ). La metodología no oficial para la determinación de ***Enterobacter sakazakii*** (Método de estrías), se recopiló de un informe presentado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO.

Para evaluar la calidad sanitaria de las diferentes matrices alimentarias se aplican los criterios microbiológicos para registro, según el Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08.

También se describen los formularios de control de calidad que acompañan a las metodologías aplicadas de acuerdo al grupo de alimentos.

**GRUPOS DE ALIMENTOS DE ACUERDO AL ORIGEN Y/O TECNOLOGÍA  
APLICADA EN SU ELABORACIÓN <sup>(2)</sup>**

## **GRUPOS DE ALIMENTOS DE ACUERDO AL ORIGEN Y/O TECNOLOGÍA APLICADA EN SU ELABORACIÓN <sup>(2)</sup>**

### **Grupo 1 - Leche y productos lácteos <sup>(2)</sup>**

Incluye todo tipo de productos lácteos derivados de la leche de cualquier animal que suele ser ordeñado (vaca, oveja, cabra, búfala). En esta categoría, un producto simple es uno que no contiene ningún saborizante, ni contiene frutas, vegetales u otros ingredientes no lácteos; tampoco se ha mezclado con otros ingredientes no lácteos, salvo lo permitido por las normas correspondientes. Similares (sucedáneos, similar o imitación) son productos en los cuales la grasa láctea ha sido reemplazada parcial o totalmente por grasas o aceites vegetales.

#### **1. Subgrupo del alimento:**

- 1.1. Leche fluida pasteurizada, con o sin saborizantes, con o sin aromatizantes
- 1.2. Leche UAT (UHT) y crema UAT (UHT) en empaque aséptico
- 1.3. Leche condensada, evaporada y dulce de leche
- 1.4. Leche en polvo, mezclas en polvo para helados y crema en polvo
- 1.5. Crema dulce, crema acida (natilla), crema batida
- 1.6. Similares de crema dulce, crema acida (natilla), crema batida
- 1.7 Mantequilla y mantequilla con especias (grasa butírica)
- 1.8 Quesos madurados y procesados
- 1.9 Quesos frescos, no madurados y requesón
- 1.10 Yogurt
- 1.11 Helados a base de leche

**Criterios microbiológicos**, Ver páginas: 158 a la 160

## **Grupo 2 - Grasas y aceites y emulsiones grasas** <sup>(2)</sup>

Incluye todos los productos a base de grasa de origen vegetal, animal o marino o sus mezclas.

### 2. Subgrupo del alimento:

#### 2.1 Margarina y otras grasas emulsionadas

**Criterios microbiológicos**, Ver página: 161

## **Grupo 3 - Hielos** <sup>(2)</sup>

Esta categoría comprende postres, dulces y golosinas a base de agua congelados, como el helado de fruta, los helados de estilo "italiano" y el helado aromatizado. Los postres congelados que contengan ingredientes principalmente lácteos se incluyen en la categoría 1.11.

### 3. Subgrupo del alimento:

#### 3.1 Hielo comestible.

#### 3.2 Helados a base de agua

**Criterios microbiológicos**, Ver página: 161

## **Grupo 4 - Frutas y hortalizas** <sup>(2)</sup>

Esta categoría principal se divide en dos: frutas y hortalizas frescas y frutas y hortalizas procesadas (incluidos raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y áloe vera), hongos comestibles y setas, algas marinas, nueces y semillas.

### 4. Subgrupo del alimento:

#### 4.1 Frutas y hortalizas frescas

## 4.2 Frutas y hortalizas procesadas

4.2.1 Frutas y hortalizas congeladas

4.2.2 Frutas y hortalizas desecadas o deshidratadas

4.2.3 Conservas hortalizas y frutas enlatadas

4.2.4 Jaleas, mermeladas y rellenos de frutas para pastelería

4.2.5 Mantequilla de maní

**Criterios microbiológicos**, Ver páginas: 161 a la 162

## **Grupo 5 - Productos de confitería** <sup>(2)</sup>

Comprende todos los productos de cacao y chocolate y derivados, otros productos de azúcar, turrone, mazapán y dulces típicos.

### 5. Subgrupo de Alimento:

5.1 Productos de cacao y chocolates y derivados (imitación y sucedáneos)

5.2 Otros productos de azúcar

5.2.1 Turrone, mazapán y dulces típicos

**Criterios microbiológicos**, Ver páginas: 162 a la 163

## **Grupo 6 - Cereales y derivados** <sup>(2)</sup>

Cereales y productos a base de cereales, derivados de granos de cereales, de raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas, excluidos los productos de panadería de la categoría de alimentos 7.0.

### 6. Subgrupo del alimento:

6.1 Cereales en hojuelas y polvo; mezclas para refresco y cereales para desayuno.

6.2 Pastas (rellenas) como por ejemplo: canelone, lasagna.

**Criterios microbiológicos**, Ver página: 163

## **Grupo 7 - Pan y productos de panadería y pastelería** <sup>(2)</sup>

Incluye las categorías relativas al pan y los productos de panadería ordinaria y los productos de panadería fina dulces, salados y aromatizados.

### 7. Subgrupo del alimento:

7.1 Pan, productos de panadería ordinaria y mezclas en polvo. Frescos o congelados.

7.2 Panadería fina con o sin relleno (galletas, queque, pasteles, tortas) otros productos de panadería fina (dulces, salados, aromatizados) y mezclas. Incluye otros productos de panadería fina, como donas, panecillos dulces y muffins, frescos o congelados.

**Criterios microbiológicos**, Ver páginas: 163 a la 164

## **Grupo 8 - Carnes y productos cárnicos** <sup>(2)</sup>

Incluye todos los tipos de productos cárnicos, de aves de corral y caza, en piezas y cortados o picados, frescos y procesados, carnes congeladas, incluyendo empanizados y rebozados y carnes enlatadas.

### 8. Subgrupo del alimento:

8.1 Productos cárnicos crudos (empacados). No incluidas materias primas.

8.1.1 Productos cárnicos crudos diferentes al pollo.

8.2 Productos cárnicos cocidos y curados (embutidos).

8.3 Carnes curadas crudas (chorizo).

8.4 Carnes congeladas, incluyendo empanizados y rebozados.

8.5 Carnes enlatadas.

**Criterios microbiológicos**, Ver páginas: 164 a la 165

## **Grupo 9 - Pescados, derivados y productos marinos** <sup>(2)</sup>

Esta amplia categoría se subdivide en categorías para el pescado fresco y para diversos productos marinos elaborados. Se incluyen en ella los vertebrados acuáticos, mamíferos acuáticos (ballenas), los invertebrados acuáticos (medusas), los moluscos (almejas y caracoles), los crustáceos (camarones cangrejos, langostas). Los productos marinos se pueden recubrir con glaseados o especias, antes de su comercialización para el consumo (filetes de pescado congelados y glaseados).

### 9. Subgrupo del alimento:

9.1 Pescado y productos marinos frescos, congelados, incluidos moluscos no bivalvos, crustáceos y equinodermos, empacados.

9.2 Pescado y crustáceos, precocidos, cocidos, salados y ahumados

9.3 Moluscos bivalvos vivos, crudos, desconchados frescos, empacados

9.4 Moluscos bivalvos y crustáceos pasteurizados o cocidos

9.5 Pescados, moluscos, equinodermos y crustáceos enlatados.

**Criterios microbiológicos**, Ver páginas: 165 a la 166

## **Grupo10 - Huevos y derivados** <sup>(2)</sup>

Incluye los huevos frescos en su cáscara y huevo entero, claras, yemas, huevos pasteurizados líquidos o deshidratados y los huevos frescos en su cáscara.

### 10. Subgrupo del alimento:

10.1 Huevos frescos en su cáscara.

10.2 Huevo entero, claras, yemas; pasteurizados líquidos o deshidratados.

**Criterios microbiológicos**, Ver página: 166

## **Grupo11 - Endulzantes o edulcorantes incluida la miel de abeja** <sup>(2)</sup>

11. Subgrupo del alimento:

11.1 Miel y jarabes (syrup)

**Criterios microbiológicos**, Ver página: 167

## **Grupo12 - Salsas, aderezos, especias y condimentos** <sup>(2)</sup>

Se trata de una categoría amplia que incluye sustancias que se añaden a un alimento para acentuar su aroma y gusto.

12. Subgrupo del alimento:

12.1 Mayonesas y aderezos (en base a huevo)

12.2 Especias, hierbas desecadas, consomés y condimentos

12.3 Salsas de tomate, mostaza y salsas para sazonar

**Criterios microbiológicos**, Ver página: 167

## **Grupo13 - Alimentos para usos nutricionales especiales** <sup>(2)</sup>

Por alimentos para regímenes especiales se entienden los elaborados o preparados especialmente para satisfacer necesidades especiales de alimentación determinadas por condiciones físicas o fisiológicas particulares, por enfermedades o trastornos específicos. La composición de estos alimentos deberá ser fundamentalmente diferente de los alimentos ordinarios con los que se comparan, en caso de que dichos alimentos existan. Los alimentos dietéticos distintos de los de esta categoría se incluyen en las categorías de los alimentos ordinarios homólogos.

13. Subgrupo del alimento:

13.1 Fórmulas lácteas y no lácteas para lactantes y niños pequeños (de 0 a 12 meses).

13.2 Alimentos complementarios para niños de pecho de más (0 a 6 meses) y niños de corta edad (6 a 12 meses).

**Criterios microbiológicos**, Ver página: 168

#### **Grupo14 - Bebidas No Alcohólicas** <sup>(2)</sup>

Esta categoría se divide en las amplias categorías de bebidas envasadas no carbonatadas, néctares, jugos no pasteurizadas, agua envasada, té y hierbas para infusión. Las bebidas lácteas figuran en la categoría 1.1

14. Subgrupo del alimento:

14.1 Bebidas envasadas no carbonatadas (jugos pasteurizados, productos concentrados).

14.2. Néctares

14.3 Jugos no pasteurizados

14.4 Agua envasada

14.5 Té y hierbas para infusión

**Criterios microbiológicos**, Ver páginas: 168 a la 169

#### **Grupo15 - Bocadillos o boquitas** <sup>(2)</sup>

Comprende todos los tipos de alimentos para el aperitivo

15. Subgrupo del alimento:

15.1 Frituras y bocadillos (snacks)

15.2 Semillas y nueces

**Criterios microbiológicos**, Ver página: 169

## **Grupo 16 - Caldos, sopas, cremas y mezclas deshidratadas** <sup>(2)</sup>

### 16. Subgrupo del alimento:

16.1 Caldos, sopas, cremas, salsas y puré de papas deshidratados instantáneos

16.2 Caldos, sopas, cremas, salsas y puré de vegetales deshidratados que requieren cocción.

16.3 Mezclas en seco instantáneas para postres (flanes, pudines y gelatinas)

**Criterios microbiológicos**, Ver página: 170

## **Grupo 17 - Alimentos listos para consumir** <sup>(2)</sup>

### 17. Subgrupo del alimento:

17.1 Alimentos preparados, listos para consumir que no requiere tratamiento térmico como por ejemplo: ensaladas.

17.2 Alimentos preparados, listos para consumir que requiere tratamiento térmico. Ejemplo: sopas instantáneas, comidas para microondas, alimentos prefabricados.

17.3 Tamales, tortillas (trigo, maíz), pupusas.

**Criterios microbiológicos**, Ver páginas: 170 a la 171

## **METODOLOGIAS ANALITICAS**

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 1 de 14
	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	Versión: 0

## 1. Objetivo

Describir el método de presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en leche y productos lácteos; grasas, aceites y emulsiones grasas; frutas y hortalizas; carnes y productos cárnicos; pescados, derivados y productos marinos; alimentos para uso nutricionales especiales; alimentos listos para consumir.

## 2. Alcance

El procedimiento aplica al grupo o subgrupo alimenticio que solicite la detección de *Listeria monocytogenes*.

## 3. Descripción y resumen del método <sup>(5)</sup>

El género *Listeria* son bacilos cortos, Gram-positivos, asporógenos, catalasa-positivos y anaerobios facultativos. Originan formas cocoides o células aisladas de 10 µm de longitud. Son móviles a 25°C, mostrando una característica movilidad de volteo, pero no son móviles a 35°C. Las colonias tienen un aspecto característico gris-azulado, que cambia a azul-verde cuando se observa con luz oblicua (iluminación de Henry). El género *Listeria*, consta de 6 especies, todas ellas emparentadas íntimamente. Las especies *Listeria innocua* y *Listeria murrayi* son consideradas apatógenas, mientras que *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii* y *Listeria welshimeri* rara vez causan infección humana, reservando para *Listeria monocytogenes* la consideración

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 2 de 14
	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	Versión: 0

de especie más importante, esta es comúnmente asociada con la **listeriosis** humana y propiamente son patógenos para los ratones y otros animales.

La metodología estándar para la detección y aislamiento de **Listeria monocytogenes** se compone de porciones analíticas de 25 g que son pre-enriquecidas para especies de **Listeria** a 30°C durante 4 h en caldo de enriquecimiento **Listeria**.

La incubación para el enriquecimiento selectivo se mantiene a 30°C para un total de 48 h. El cultivo de enriquecimiento es estriado a las 24 y a las 48 horas en uno de los medios selectivos diferenciales con el fin de aislar a las especies de **Listeria**.

#### 4. Materiales y equipo

1. Bolsas estériles.
2. Cuchillos, espátulas, pinzas, tijeras, cucharas estériles
3. Placas de Petri.
4. Erlenmeyer de 500 ml
5. Tubos de fermentación (Durham).
6. Marcador.
7. Aceite de inmersión
8. Asa de Inoculación en punta y en anillo.
9. Aguja calibre 26, 3 / 8 pulgadas.
10. Pipetas de 25, 10, y 1 ml.
11. Tubos de 16 x 125 mm con tapón de rosca.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 3 de 14
	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	Versión: 0

12. Portaobjetos.
13. Cubreobjetos de vidrio.
14. Refrigeradora.
15. Balanza con capacidad de 2000 g de peso y sensibilidad de 0,1 g
16. Stomacher.
17. Incubadoras de 30 y 35 °C
18. Microscopio de contraste de fase con el objetivo de la fase de aceite de inmersión (100X).
19. Lámpara de luz blanca

## 5. Reactivos y medios de cultivo

1. Ácido acético 5 N
2. Monoclorhidrato de Acriflavina
3. Acido sulfúrico (Reactivo A)
4. N-(1-naftil) etilendiamina (reactivo B)
5. Reactivo  $\alpha$ -Naftol (reactivo C)
6. Cicloheximida
7. Natamicina (pimaricina)
8. Etanol absoluto
9. Anhídrido Glicerina
10. KOH al 40% de solución
11. Solución de peróxido de hidrógeno al 3%
12. Ácido nalidíxico (sal de sodio)
13. Reactivo de ácido sulfanílico

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 4 de 14
	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	Versión: 0

14. Solución salina fisiológica al 0,85%
15. Kit de tinción de Gram
16. Sangre de carnero desfibrinada
17. Base de agar sangre N ° 2
18. Agar Cloruro de litio-feniletanol-moxalactam (LPM) con esculina e hierro
19. Medio de reducción de nitrato y reactivos de detección
20. Caldo nutritivo
21. Caldo purpura base de fermentación de carbohidratos, que contiene 0,5% de las soluciones de dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa
22. Medio de prueba de la motilidad (MTM)
23. Agar tripticasa de soya con 0,6% de extracto de levadura (TSA+EY)
24. Caldo tripticasa de soya con 0,6% de extracto de levadura (TSB+EY)
25. Agar Oxford (medio OXA)
26. Caldo de enriquecimiento *Listeria*
27. Agar PALCAM
28. Caldo Triptosa y Agar triptosa

## 6. Procedimiento <sup>(5)</sup>

### A. Muestreo y enriquecimiento

Tratamiento de la muestra

Para la manipulación, almacenamiento y envío de materiales a ser analizados para *Listeria monocytogenes* se recomienda refrigeración a 4°C, temperatura en la cual crecerá, aunque lentamente si otras condiciones lo permiten. Sin

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 5 de 14
	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	Versión: 0

embargo, si la muestra ya está congelada, no debe ser descongelada hasta el análisis.

Muestras compuestas.

En general, la muestra se prepara de la siguiente manera: una muestra de mucho alimento consta de 10 sub-muestras (líquido, crema o alimentos sólidos) y 50 g o ml de cada sub-muestra se utilizan para hacer dos muestras compuestas (250 g cada una). Tener cuidado de hacer sub-muestras representativas de la superficie exterior de un alimento, así como su interior.

Mezclas de muestras

Si las muestras compuestas no son necesarias, mezcle solo 25 g de alimento con 225 ml del caldo de preenriquecimiento. Si el alimento es sólido se procede a molerlo con ayuda de bolsas estériles y se coloca en el stomacher por 30 segundos, pero si es líquido, semisólido o sólido que no necesita molerse, solo se homogeniza bien y se incuba a 30°C por 24 – 48 horas.

## B. Aislamiento

- A las 24 y las 48 horas, estríe en uno de los siguientes medios de agares selectivos de aislamiento: OXA (OXFORD) o PALCAM preferiblemente. Incube OXA, PALCAM a 35°C durante 24-48 horas. Las colonias de *Listeria* son de color negro con un halo negro de esculina que contienen los medios de cultivo.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 6 de 14
	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	Versión: 0

Algunas otras bacterias pueden formar colonias débilmente marrón negro, pero el desarrollo del color toma más de 2 días. Ver Figura N° 2.

- Transfiera colonias típicas de OXA y PALCAM a agar Trypticase de soya con extracto de levadura (TSA+EY) para purificar y obtener colonias típicas aisladas. La purificación en TSA+EY es un paso obligatorio en el análisis convencional. Al menos 5 aislamientos son necesarios porque más de una especie de *Listeria* puede ser aislada de la misma muestra. La *Listeria monocytogenes* y la *Listeria ivanovii* pueden distinguirse utilizando un medio comercial de confirmación (Biosynth International, Inc.), o por caldos convencionales de fermentación de xilosa o ramnosa, o por agar.
  
- Incube las placas de TSA+EY a 30°C durante 24-48 h.

**NOTA:** Las placas se incuban a 35°C si las colonias no serán utilizadas para la observación de la motilidad.

### C. Identificación

Identifique las colonias aisladas por las pruebas clásicas siguientes:

- Examine en las placas TSA+EY las colonias típicas con iluminación de transmisión oblicua Henry, las colonias se observan de un color azul-gris. Esta prueba es útil en esta etapa, pero no es obligatoria.
  
- Incube la colonia típica del cultivo a 30°C o menos y examine al fresco,

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 7 de 14
	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	Versión: 0

utilizando solución salina al 0,85% para la suspensión en un objetivo y con aceite de inmersión en microscopio de contraste de fase. Elija una colonia con un crecimiento suficiente para hacer una suspensión bastante pesada y emulsione bien. Si utiliza insuficiente crecimiento, las pocas células presentes se adhieren a la lámina de vidrio y parecen no móviles. La *Listeria spp* son bastoncillos cortos con un ligero giro el cual se debe a la motilidad. Cocos, bacilos grandes o bastones con motilidad rápida no son *Listeria spp*.

- De esta colonia típica también inocule en un tubo de TSB+EY para la fermentación de carbohidratos y de los medios de prueba. Incube a 35°C durante 24 h. Esta colonia puede mantenerse a 4°C por varios días y se utiliza en varias ocasiones como inóculo.

## **PRUEBAS PRESUNTIVAS** <sup>(5)</sup>

**Catalasa.** Ver Figura N° 3.

Realice esta prueba utilizando una gota de peróxido de hidrogeno al 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en un porta objetos y emulsione una colonia típica aislada del TSA+EY. La presencia de burbujeo da como positiva la prueba.

**NOTA:** No utilice asa metálica ya que el metal puede reaccionar con el peróxido y dar un falso-positivo.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 8 de 14
	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	Versión: 0

### Tinción de Gram

Se realiza con colonias de 16 a 24 h de incubación. Todas las *Listeria spp* son bacilos Gram-positivos, producen ácido de la D-glucosa, hidrolizan la esculina, dan positivas las reacciones de Voges-Proskauer y del rojo metilo, son bacilos cortos, sin embargo, con las colonias más antiguas en la tinción de Gram, la reacción puede ser variable y puede aparecer también células cocoides. Las células tienen una tendencia a la empalizada de gruesas extensiones teñidas. Esto puede conducir al rechazo de falso como un difterioide.

**Hemolisis.** Ver Figura N° 4.

- Siembre las colonias en TSA+EY, en agar sangre 5% (sangre de oveja desfibrinada) con punciones en placas. Dibuje una rejilla de 20-25 espacios en el fondo de la placa. Pinche una colonia por espacio de la red. Siempre pinche los controles positivos (*Listeria ivanovii* y *Listeria monocytogenes*) y el control negativo (*Listeria innocua*). Incube durante 24-48 horas a 35°C. intentando pinchar lo más cerca al fondo de la capa de agar, de ser posible, sin llegar a tocar el fondo de la capa de agar y posiblemente romper el agar.
- Examine las placas de agar sangre que contiene punciones de la colonia con la luz brillante. *Listeria monocytogenes* y *Listeria seeligeri* producen una zona un poco clara alrededor de la punción. La *Listeria innocua* no muestra ninguna zona de la hemólisis, mientras que la *Listeria ivanovii* produce una zona clara bien definida alrededor de la punción. No trate de diferenciar las

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 9 de 14
	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	Versión: 0

especies en este punto, pero la naturaleza se nota en la reacción hemolítica. Resuelva las reacciones cuestionables por la prueba de CAMP. (Nota: La hemólisis es más fácil de determinar cuando la profundidad del agar sangre es más delgada que la de 5 mm de costumbre. Opcionalmente, se puede lograr, mediante el uso de una capa de agar sangre (1-2 mm).

## PRUEBAS CONFIRMATIVAS <sup>(5)</sup>

**Movilidad.** Ver Figura N° 5.

Inocule con asa en punta en MTM del crecimiento en TSA+EY e incube durante 7 días a temperatura ambiente. Observe todos los días. La *Listeria spp* son móviles, dando un paraguas típicos-como el patrón de crecimiento. MTM da paraguas mas definidos. Alternativamente, observe las colonias de TSA+EY incubadas a 30°C, por medio del microscopio de contraste de fase (× 1000) para ver la motilidad.

## Prueba de Carbohidratos

De la colonia inoculada en TSB+EY, inocule en soluciones con 0,5% (P/V) en el caldo púrpura de carbohidratos (el uso de tubos de Durham es opcional): dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa. Incube 7 días a 35°C. *Listeria spp* reacciona positivamente produciendo ácido sin gas. **Ver Cuadro N°1**, para reacciones de xilosa y ramnosa de *Listeria spp*. Todas las especies deberían ser positivas para dextrosa, esculina y maltosa. Todas las *Listeria spp* excepto *Listeria grayi* en agar manitol deberá ser negativo.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 10 de 14
	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	Versión: 0

Si la pigmentación de la cepa en OXA, PALCAM es inequívoca, la prueba de esculina podrá omitirse.

### Prueba CAMP. Ver Figura N° 6

La prueba Christie Atkins Munch Peterson (CAMP) es útil para confirmar la especie en particular cuando el agar sangre es pinchado y en la prueba los resultados son equívocos. Para realizar la prueba se necesita, rayar una colonia de *Staphylococcus aureus* que es  $\beta$ -hemolítico y una colonia de *Rhodococcus equi* en paralelo y diametralmente opuestas entre sí en una placa de agar sangre. Coloque varias rayas de colonias de pruebas paralelas entre sí, pero en ángulo recto entre los *S. aureus* y *R. equi*. Después de la incubación a 35°C durante 24-48 h, al examinar las placas de hemólisis de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* las reacciones hemolíticas se han mejorado en la zona influenciada por la colonia en raya de *S. aureus*. La reacción de *L. monocytogenes* suele ser óptima a las 24 h en lugar de 48 h. Para obtener suficiente *R. equi* para proporcionar una buena raya de crecimiento, incube la colonia de agar inclinado de 48 h en lugar de 24 h. El uso de este control en aislamientos de *Listeria spp* separado en una placa de agar sangre es recomendable. Las placas de agar sangre deben ser lo más frescas posible.

Las líneas horizontales representan las inoculaciones de 5 cepas de prueba. Las líneas verticales representan inoculaciones de *Staphylococcus aureus* (S) y *Rhodococcus equi* (R). Las líneas rayadas indican (sólo en el diagrama) la localización de las regiones de hemólisis. Ver Figura N° 6.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 11 de 14
	Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	Versión: 0

Separe las rayas verticales de modo que las cepas de prueba puedan ser rayadas horizontalmente entre ellas sin llegar a tocarlas. Después de 24 y 48 h de incubación a 35°C, examine las placas de la hemólisis en la zona de influencia de las rayas verticales. Ver Figura N° 6.

La hemólisis de *L. monocytogenes* es mayor cerca de la raya de *S. aureus* que a la raya de *R. equi*. Ver Cuadro N° 2.

**7. Formulario de calidad.** Ver página N° 173.

### Marcha.

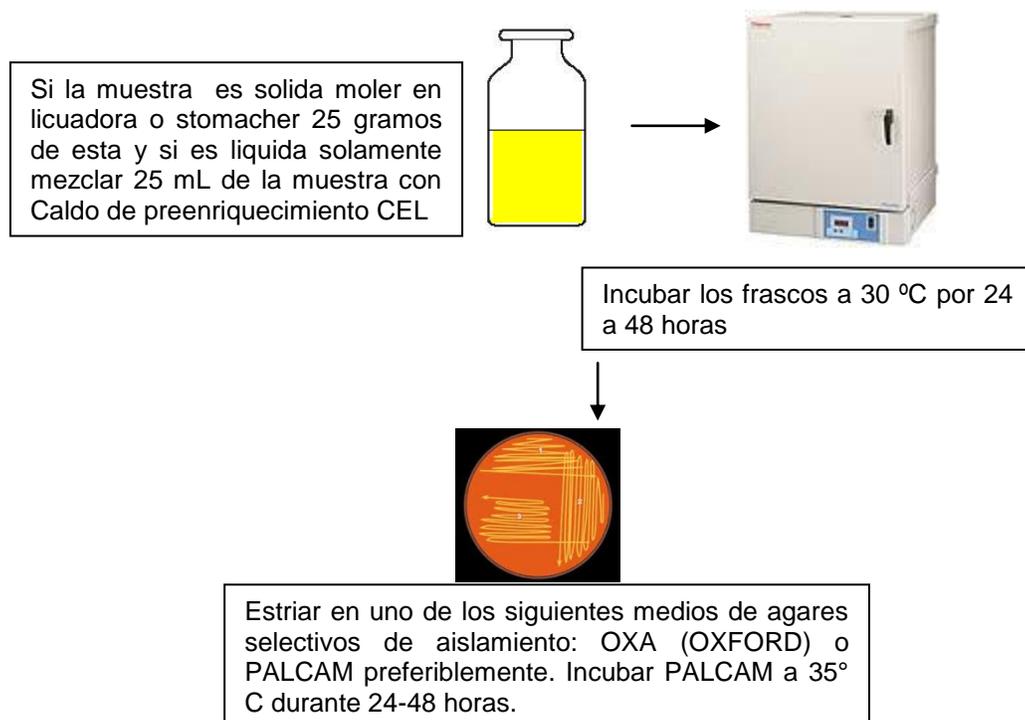


Figura N°1. Esquema de trabajo de *Listeria monocytogenes*.

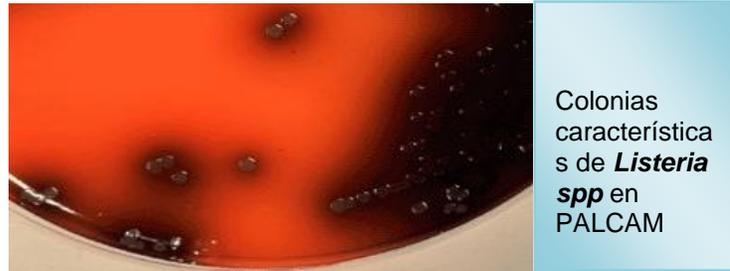


Figura N°2. Colonias características de *Listeria spp* en Palcam



Figura N°3. Prueba de catalasa positiva

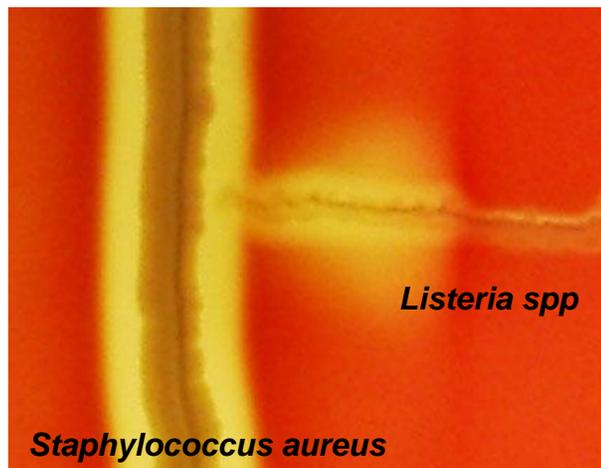


Figura N° 4. Hemolisis en agar sangre.

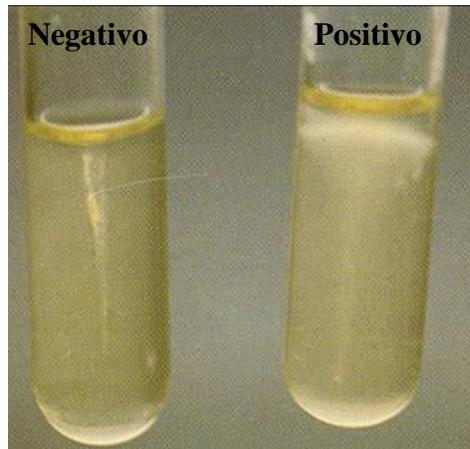


Figura N° 5. Prueba de movilidad para *Listeria spp* (Forma de paraguas)

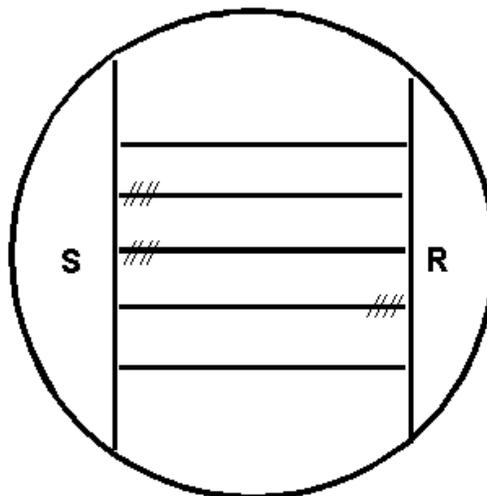


Figura N° 6. Prueba de CAMP

Cuadro N° 1. Cuadro de diferenciación de especies de *Listeria* <sup>(5)</sup>

Especies	Acido producido por				
	$\beta$ -Hemolisis <sup>a</sup>	Mannitol	Rhamnosa	Xilosa	Virulencia <sup>b</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-	+
<i>L. ivanovii</i> <sup>c</sup>	+	-	-	+	+
<i>L. innocua</i>	-	-	V <sup>d</sup>	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	V <sup>d</sup>	+	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+	-
<i>L. grayi</i> <sup>e</sup>	-	+	V <sup>d</sup>	-	-

<sup>a</sup> Agar sangre.

<sup>b</sup> prueba en ratones.

<sup>c</sup> Cepas fermentadoras de Ribosa se clasifican como: *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* y no fermentadores de ribosa como: *L. ivanovii* subsp. *Londiniensis*.

<sup>d</sup> V, biotipos variables

<sup>e</sup> Incluye dos subespecies - *L. grayi* subsp. *murrayi* reduce el nitrato *L. grayi* subsp. *grayi* no reduce los nitratos.

Cuadro N° 2. Prueba hemolítica CAMP para diferentes especies de *Listeria* <sup>(5)</sup>

Especies	Hemolisis	
	<i>Staphylococcus aureus</i> (S)	<i>Rhodococcus equi</i> (R)
<i>L. monocytogenes</i>	+	-*
<i>L. ivanovii</i>	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-

\* son raras las cepas S+ y R+. La reacción de R+ es menos pronunciada que la de *L. ivanovii*.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 1 de 5
	Enumeración de Mohos y Levaduras	Versión: 0

## 1. Objetivo

Describir el método de enumeración de Mohos y Levaduras que pueden estar presentes en los alimentos.

## 2. Alcance

Esta metodología aplica a todo tipo de alimento para el cual se desee determinar la presencia de Mohos y Levaduras.

## 3. Descripción y resumen del método <sup>(5)</sup>

Técnica de Siembra directa y dilución en placa.

El método de siembra directa es eficiente para la detección de las distintas especies de mohos, incluyendo la mayoría de los productores de la toxina, pero es menos eficaz en la detección de levaduras. También se utiliza para determinar si la presencia del moho es debido a la contaminación externa o interna de la invasión.

Esta metodología consiste en realizar diluciones de una muestra y sembrándolas directamente en placas para obtener un conteo de la cantidad de mohos y levaduras que posee la muestra.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 2 de 5
	Enumeración de Mohos y Levaduras	Versión: 0

#### 4. Materiales y equipo

1. Bolsas estériles whirl pak.
2. Cuchillos, tenedores, espátulas, pinzas, tijeras, cucharas estériles.
3. Pipetas estériles graduadas de 1.0 y 10.0 ml.
4. Placas petri estériles.
5. Incubadora a 25 °C (Temperatura ambiente).
6. Balanza con capacidad de 2000 g de peso y sensibilidad de 0,1 g
7. Stomacher.

#### 5. Medios de cultivo

1. Agar Dicloran glicerol 18% (DG18)
2. Agar Papa dextrosa (PDA)
3. Agua peptonada al 0,1% para dilución (225 ml, 450 ml, 90ml). (AP 0,1%)

#### 6. Procedimiento <sup>(5)</sup>

- Pese o mida 25 o 50 g/ml de la muestra de forma aséptica.
- Agregue asépticamente 225 ml o 450 ml de AP 0,1% (dilución  $10^{-1}$ ).
- Homogenice utilizando el stomacher durante 2 min.
- Haga las diluciones que sean necesarias: 1:10, 1:100; 1:1000 etc.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 3 de 5
	Enumeración de Mohos y Levaduras	Versión: 0

- Transfiera asépticamente 1.0 ml de dilución de la muestra en placas de Petri y de inmediato agregue 20-25 ml de agar Dicloran Glicerol DG18.
- Mezcle las placas girando suavemente hacia la derecha, luego a la izquierda y por ultimo en forma de 8, teniendo cuidado para evitar derrames.
- Trabaje cada dilución por triplicado.
- Incube las placas en la oscuridad a 25°C. Coloque las placas una sobre otra haciendo columnas máximo de tres y no invertirlas.
- Cuente las placas después de 5 días de incubación. Si no hay crecimiento en 5 días, vuelva a incubar por otras 48 h. No cuente las colonias antes de que finalice el período de incubación debido a que la manipulación de las placas puede resultar en el crecimiento secundario de las esporas liberadas por movimientos en la manipulación, dando un conteo irreal de la cantidad presente en la muestra.
- Cuente las placas que contienen de 10 a 150 colonias.
- Informe de resultados en unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo o mililitro, basado en el recuento del promedio de las tres placas y el resultado presentarlo con dos cifras significativas. Si el tercer dígito es de 6 o superior, redondee cifras anteriormente (por ejemplo, 456 = 460), si cuatro o menos, redondee a un dígito a continuación (por ejemplo, 454 = 450).

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 4 de 5
	Enumeración de Mohos y Levaduras	Versión: 0

Si el tercer dígito es 5, redondee a un dígito a continuación: si los 2 primeros dígitos son un número par (por ejemplo, 445 = 440); redondee a un dígito por encima si los 2 primeros dígitos son un número impar (por ejemplo, 455 = 460). Cuando las placas de todas las diluciones no tienen colonias, informe el resultado de mohos y levaduras (ML) como menor de 1 con respecto a la dilución más baja utilizada (por ejemplo tiene 0 ML en la dilución 1:10 ó  $10^{-1}$ , se informa como  $<10$  UFC/ g o ml).

**NOTA:** Si quiere identificar la especie de hongo presente en el alimento, aísle las colonias individuales en Agar Papa Dextrosa PDA o en Dicloran Glicerol DG18. Si es moho, no estríe, solo deposite un poco de las esporas en el centro de la placa e incube; si es levadura estríe en toda la placa e incube. Observe al microscopio con lactofenol azul de algodón.

## 7. Formulario de calidad. Ver página N° 174.

### Marcha.

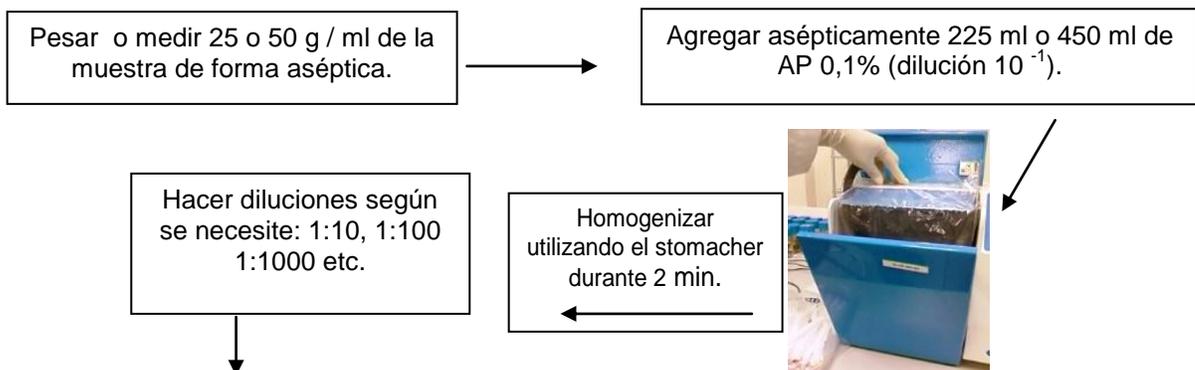
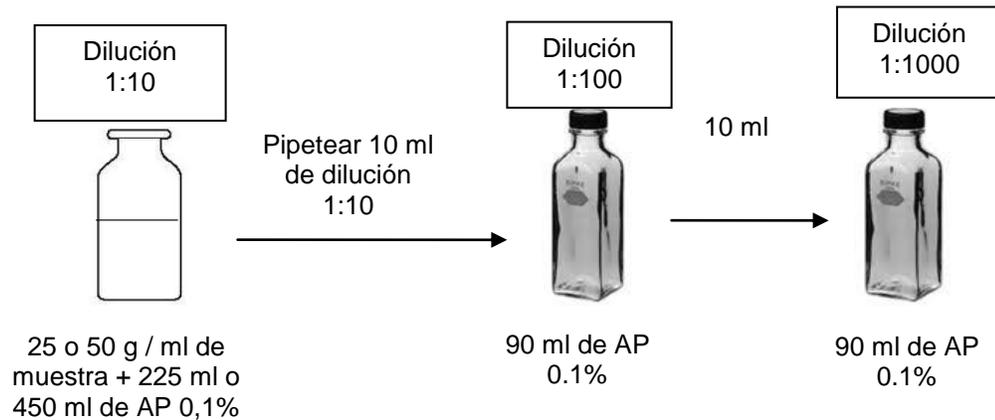


Figura N°7. Esquema de enumeración de mohos y levaduras



Agregar 20-25 ml de agar DG18 y homogenizar en forma de 8. Dejar secar e incubar las placas sin invertirlas en la oscuridad a 25°C.

Contar las placas después de 5 días de incubación. Si no hay crecimiento en 5 días, volver a incubar por otras 48 h. Contar las placas que contienen de 10 a 150 colonias

Continuación de Figura N° 7

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 1 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión: 0

## 1. Objetivo

Determinar y enumerar Bacterias coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli* y Enterobacterias en leche y productos lácteos; grasa, aceites y emulsiones grasas; Helados a base de agua; frutas y hortalizas; cereales en hojuela y polvo, mezcla para refresco y cereales para desayuno; pan, productos de panadería y pastelería; carnes y productos cárnicos; pescado, derivados y productos marinos; huevos y derivados; salsa de tomate, mostazas y salsas de sazonar; bebidas no alcohólicas sin incluir el agua envasada; bocadillos; caldos, sopas, cremas y mezclas deshidratadas; alimentos listos para consumir.

## 2. Alcance

Esta metodología es aplicable a todo tipo de muestra de alimento a la cual se le desee determinar las bacterias coliformes, la *Escherichia coli* y las Enterobacterias.

## 3. Descripción y resumen del método <sup>(5)</sup>

La denominación genérica Coliformes se designa a un grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y los alimentos.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 2 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y <i>Enterobacterias</i>	Versión: 0

No todos los coliformes son de origen fecal, por lo que se hizo necesario desarrollar pruebas para diferenciarlos a efectos de emplearlos como indicadores de contaminación. Se distinguen, por lo tanto, los coliformes totales que comprende la totalidad del grupo y los coliformes fecales aquellos de origen intestinal.

En alimentos los coliformes no se consideran indicadores de contaminación fecal sino solamente indicadores de calidad.

La *Escherichia coli* se encuentra ampliamente distribuida en el intestino de los seres humanos y animales de sangre caliente, es el anaerobio facultativo predominante en el intestino y parte de la flora intestinal esencial que mantiene la fisiología del huésped sano.

Es un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, que incluye muchos géneros, incluidos los agentes patógenos conocidos, como *Salmonella sp*, *Shigella* y *Yersinia*. La *Escherichia coli* cuando se ingiere, causa enfermedades gastrointestinales en humanos. Esta bacteria es Gram-negativa, anaerobia facultativa con forma de bacilo que fermenta la lactosa para producir ácido y gas dentro de 48 horas a 35°C.

La prueba NMP en serie de 3 tubos se considera el método convencional para la determinación de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*, el cual, se utiliza en la mayoría de los alimentos.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 3 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión: 0

El Número Más Probable (NMP) es un método estadístico de múltiples pasos de ensayo que consiste en una serie de fases, la fase presuntiva, la fase confirmativa y la fase completa.

En el ensayo, varias diluciones de una muestra se inoculan en caldo de cultivo. Se debe anotar el número de los tubos con turbidez y producción de gas como positivos (fermentación de la lactosa), de los cuales se realizan las otras 2 fases del ensayo. Se utiliza las combinaciones de resultados positivos y se consultan en las tablas estadísticas del NMP, para estimar el número de organismos presentes. Normalmente sólo las dos primeras fases se realizan en el análisis de detección de coliformes totales y coliformes fecales, mientras que la tercera fase se realiza para la detección de la *Escherichia coli*.

#### **El método sólido <sup>(5)</sup>**

La metodología convencional es preparar, homogenizar y diluir la muestra de forma decimal. Transfiera dos alícuotas de 1 ml de cada dilución a placas Petri, verter aproximadamente 10 ml VRBA a más o menos 45°C en las placas, mezcle y deje solidificar. Invertir las placas e incube durante 18-24 horas a 35°C o 32°C, examinar las placas en cuenta colonias.

#### **4. Materiales y equipo**

1. Cuchillos, espátulas, pinzas, tijeras, cucharas estériles.
2. Bolsas estériles whirl pak.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 4 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión: 0

3. Pipetas estériles graduadas de 1,0 y 10,0 ml
4. Placas petri estériles.
5. Tubos con tapón de rosca y tubos de fermentación.
6. Asa metálica en aro y en punta.
7. Balanza con capacidad de 2000 g de peso y sensibilidad de 0,1 g
8. Stomacher.
9. Baño de agua a  $45,5 \pm 0,2$  °C.
10. Incubadora de  $35 \pm 1,0$  °C
11. Lámpara de luz ultravioleta de onda larga.
12. Cuenta colonias.

## 5. Reactivos y medios de cultivo

1. Reactivo de Kovacs.
2. Reactivo de Voges-Proskauer (VP).
3. Reactivos de tinción de Gram.
4. Indicador rojo de metilo.
5. Buffer fosfato de 450 ml y 90 ml.
6. Caldo Lauril triptosa (LST).
7. Caldo verde brillante bilis lactosa (Brilliant green lactose bile broth 2%) BGLB al 2%.
8. Caldo EC.
9. Caldo EC-MUG.
10. Caldo Triptona (triptófano).
11. Caldo MR-VP.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 5 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión: 0

12. Caldo citrato Koser.
13. Agar Rojo Violeta Bilis (VRBA).
14. Agar Rojo Violeta Bilis, VRBA-MUG.
15. Agua peptonada al 0,1%.
16. PCA, Plate Count Agar.
17. Agar de Levine eosina-azul de metileno (L-EMB)

## 6. Procedimiento <sup>(5)</sup>

### Método del numero más probable (NMP)

A - Fase presuntiva para coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*.

- Pese 50 g de alimentos.

**NOTA:** Las muestras congeladas pueden ablandarse guardándolas durante aproximadamente unas 18 horas de 2-5°C, pero no descongelar completamente.

- Añada 450 ml Buffer fosfato y mezcle durante 2 minutos en el stomacher.  
(Dilución  $10^{-1}$ )

**NOTA:** Agregue una porción de diluyente para evitar que se derrame al momento de pasar la muestra por el stomacher y luego complete el volumen.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 6 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión: 0

Si dispone de menos de 50 g de muestra, pese una porción equivalente a la mitad de la muestra y agregue el volumen suficiente de diluyente estéril para realizar una dilución 1:10 ( $10^{-1}$ ) (25 g en 225 ml de diluyente).

- Prepare diluciones decimales con diluyente estéril. El número de diluciones que prepare depende de la densidad de coliformes previsto.
- Agite todas las suspensiones 25 veces en forma de arco. No utilice pipetas para dispensar menos del 10% de su volumen total.
- Transfiera 1 ml a 3 tubos de LST para cada dilución de al menos 3 diluciones consecutivas. Mantenga la pipeta en un ángulo de manera que el borde inferior se apoye contra el tubo. No debe de transcurrir más de 15 minutos desde que preparo la muestra, hasta que todas las diluciones se inoculan en el medio adecuado.

**NOTA:** Utilice 5 tubos de LST para el análisis de los mariscos y la cosecha de las aguas para cría de moluscos.

- Incube los tubos LST a 35°C. Examine los tubos a las  $24 \pm 2$  h para ver las reacciones y si hay presencia de gas, es decir, el desplazamiento del vial por medio de la fermentación o efervescencia al agitar suavemente. Incube durante otras 24 h si las reacciones son negativas (tubos sin gas) y examine de nuevo a un total de  $48 \pm 2$  h.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 7 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión: 0

- Realice prueba en todos los tubos presuntamente positivos (gas).

**B - Fase confirmativa para coliformes totales.**

- Transfiera de cada tubo LST con gas, con ayuda de un asa, parte de la suspensión a un tubo con caldo BGLB, evitando tomar parte de la película si está presente.

- Incube los tubos de BGLB a 35°C y examine la producción de gas a las 24 ± 2 h y a las 48 ± 2 h.

Calcule el número más probable (NMP) de coliformes totales basado en la formación de gas de los tubos de BGLB para 3 diluciones consecutivas. Ver Tabla N° 1.

**C - Fase confirmativa para coliformes fecales y *Escherichia coli*.** Ver Figura N° 11.

- De cada tubo de LST con gas de la fase presuntiva transfiera una asada llena de suspensión a cada uno de los tubos con caldo EC.

- Incube los tubos de EC a 45,5°C por 24 ± 2 horas y examine la producción de gas. Si a las 24 ± 2 horas da negativo, reincube y examine de nuevo a las 48 ± 2 h.

Utilice los resultados de esta prueba para calcular el NMP de coliformes fecales.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 8 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión: 0

**NOTA:** Para el análisis de coliformes fecales la temperatura de incubación es de  $45,5 \pm 0,2$  °C para todos los alimentos, a excepción de las pruebas de agua y en los mariscos y en el análisis de agua de cosecha para cría de moluscos, que utiliza una temperatura de incubación de  $44,5 \pm 0,2$  °C.

Por otra parte, para la determinación de *Escherichia coli* realice la siembra del caldo LST a caldo EC-MUG (4-metil- $\beta$ -umbeliferil-D-glucurónido). Después de la incubación, observe la fluorescencia azulada que presentan los tubos bajo luz ultravioleta de onda larga y según los que presenten fluorescencia utilice la tabla 1 para obtener el NMP de la *Escherichia coli*.

D. Fase completa para la determinación de *Escherichia coli*.

### FASE PRESUNTIVA

- Agite suavemente cada tubo de caldo EC o EC-MUG con presencia de gas y estríe para el aislamiento con un asa metálica en aro a una placa de agar L-EMB e incube durante 18-24 horas a 35°C.
- Examine las placas para ver colonias sospechosas de *Escherichia coli*. Las colonias son planas con centro oscuro, con o sin brillo metálico.
- Transfiera un aproximado de 5 colonias sospechosas de cada placa de L-EMB a agar plate count (PCA) inclinado e incube durante 18-24 horas a 35°C.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 9 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión: 0

**NOTA:** La identificación de cualquiera de 1 de las 5 colonias de *Escherichia coli*, es suficiente para concluir como positivo el tubo de EC o EC-MUG, por lo que no todos los cinco aislamientos posible que tenga que hacerse la prueba.

- Realice la tinción de Gram usando el tubo inclinado de PCA de la fase presuntiva.

Realizar las reacciones IMVIC (Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato) a todas las colonias que aparecen como bacillos cortos Gram-negativos, y también puede volver a inocular en LST para confirmar la producción de gas.

### **FASE CONFIRMATIVA**

Para las siguientes pruebas, utilice el inóculo que se encuentra en PCA inclinado.

#### **Indol**

- Inocule un tubo de caldo triptona e incube  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$
- Adicione 0.2-0.3 ml de reactivo de Kovacs. La aparición de un color rojo en la parte superior del caldo da como positiva la presencia de *Escherichia coli*.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 10 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión: 0

- Inocule 2 tubos de caldo MR-VP e incube  $48 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ , uno para la prueba de VP y el otro para MR.

**Voges-Proskauer (VP).** A las  $48 \pm 2$  horas:

- Añada 0,6 ml de solución de  $\alpha$ -naftol y 0,2 ml de KOH 40%, y agite.
- Añada unos cristales de creatina.
- Agite y deje reposar 2 h. La Prueba es positiva si el color rosa de la eosina se desarrolla.

**Rojo de metilo.** A las  $48 \pm 2$  horas:

- Añada 5 gotas de solución de rojo de metilo al tubo de MR-VP. La aparición de un color rojo es reacción positiva, pero un color amarillo es reacción negativa.

**Citrato.**

- Inocule ligeramente el tubo de caldo citrato de Koser; pero evite la turbidez detectable.
- Incube durante 96 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . El desarrollo de la turbidez distinta a la de la inoculación es reacción positiva.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 11 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión: 0

### Fermentación de la lactosa.

- Inocule un tubo de LST e incube  $48 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . La producción de gas o efervescencia después de una ligera agitación es la reacción positiva.

**Interpretación:** Todas las colonias que al fermentar la lactosa producen gas dentro de 48 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ , que son bacilos Gram-negativos y en las pruebas bioquímicas resultan con un IMVIC: + + - - (biotipo 1) o - + - - (biotipo 2), se considera que es *Escherichia coli*.

Calcule el NMP de *Escherichia coli* basado en los tubos de EC positivos en 3 diluciones sucesivas que contienen *Escherichia coli*. Ver Tabla N° 1.

**Ejemplo de uso de tabla del NMP**, lectura de tubos de una muestra de ensalada fresca, para la determinación de coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y *Escherichia coli* (EC) por el método de NMP.

Tabla N°1. Ejemplo del uso de tabla del NMP

Dilución	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	RESULTADO
Lauril sulfato	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	<b>CT</b> = $3-3-1 \times 10^4$ : 46,000
BGLB	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	<b>CF</b> = $3-2-1 \times 10^3$ : 1,500
EC- MUG	3/3	3/3	2/3	1/3	0/3	<b>EC</b> = $3-1-0 \times 10^2$ : 43
Fluorescencia	3/3	1/3	0/3	0/3	0/3	NMP/ g de muestra

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 12 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión: 0

### Explicación del cuadro de ejemplo de tablas de NMP

Lectura después de incubar 35°C por 48 horas las diluciones en tubos de lauril sulfato.

Seleccione los tubos que dieron positiva la presencia de gas y turbidez, inocule en tubos conteniendo caldo BGLB y EC-MUG, luego incube por 48 horas a 35°C los tubos de BGLB y por 24 horas a 45°C los tubos de EC-MUG.

Realice la lectura de dichos tubos auxiliándose de la tabla de lectura del NMP y en base a los resultados obtenidos: positivos y negativos vea la combinación de tubos que corresponde según el caso.

En este caso, para los tubos con caldo BGLB se realizó la lectura de las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , las cuales corresponden a la combinación 3-3-1 que son los tubos que presentaron turbidez, luego al buscar dicha combinación en las tablas NMP da un resultado de 460 NMP/g, luego dicha cantidad se multiplica por 100 obteniendo un resultado de 46,000 NMP/g de coliformes totales en la muestra de ensalada fresca.

Para tubos con caldo EC-MUG se realizó la lectura de las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , las cuales corresponden a la combinación de tubos 3-2-1. Luego al buscar dicha combinación en las tablas del NMP da una cantidad de 150 NMP/g la cual se multiplica por 10 y da un resultado de 1500 NMP/g de coliformes fecales en la muestra de ensalada fresca.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 13 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión: 0

Después de revisar los tubos que dieron turbidez positiva en caldo EC-MUG, se procedió a observar a través de la lámpara de luz UV la presencia de fluorescencia la cual indica prueba positiva para *E.coli*. Se realizó la lectura de tubos de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , para los cuales se obtuvo una combinación de 3-1-0, la cual al buscar en las tablas del NMP da un resultado de 43 NMP/g de *Escherichia coli* en muestra de ensalada fresca.

**NOTA:** Como alternativa, en lugar de realizar la prueba IMVIC, utilice el ensayo en API 20 E para identificar la *Escherichia coli*. Utilice el crecimiento del PCA inclinado y lleve a cabo este ensayo como es descrito por el fabricante.

**7. Formulario de calidad.** Ver página N° 175.

### **Método sólido (UFC).**

- Realice diluciones decimales según estime conveniente.
- Transfiera 1 ml de cada dilución a placas de Petri.
- Agregue un aproximado de 15 ml de medio VRBA a una temperatura aproximadamente de 48°C en cada placa, mezcle en forma de 8 y deje solidificar.
- Invierta las placas e incube por 18-24 horas a 35 °C.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 14 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión: 0

- Examine las placas en un cuenta colonias, bajo lupa y con buena iluminación.

- Cuento todas las colonias que están presentes en las placas ya que en este medio crecen las Enterobacterias. Para poder contar las placas debe de tener una carga de más o menos de 25 a 250 colonias.

Determine el número de Enterobacterias presentes en la muestra multiplicando el promedio de las placas por el factor de dilución de la muestra.

- Las colonias rojo-púrpura de 0,5 mm o más de diámetro y rodeadas de una zona de precipitación de ácidos biliares son coliformes totales.

- Para confirmar que las colonias son coliformes, pique por lo menos 10 colonias de cada placa y transfiera a tubos con caldo BGLB.

- Incube los tubos a 35°C, examine a las 24 y 48 h para la producción de gas.

**NOTA:** Si en el tubo de BGLB con gas se muestra una película, realice la tinción de Gram para garantizar que la producción de gas no se debió a la fermentación de bacilos-positivos, fermentadores de lactosa.

Determine el número de coliformes por gramo multiplicando el número de colonias sospechosas por ciento confirmado en BGLB por el factor de dilución.

Por otra parte, desea determinar la presencia de coliformes fecales y *Escherichia coli* realice lo mismo que los primeros tres pasos.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 15 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión: 0

- Invierta las placas e incube por 18-24 horas a 45°C.

Las colonias características en VRBA de *Escherichia coli* color rojo-púrpura y rodeadas por una zona con un precipitado ácido de bilis, se pueden distinguir entre las colonias de coliformes fecales características en VRBA color rojo purpura y rodeadas por un precipitado ácido de bilis, añadiendo 100 g de 4-metil-β-umbeliferil-D-glucuronido (MUG) por ml en la superposición VRBA. Después de la incubación, se pueden observar las placas por medio de la lámpara de luz Ultravioleta de onda larga si presenta fluorescencia azulada alrededor de las colonias indica la presencia de *E.coli*.

**7. Formulario de calidad.** Ver página N° 176.

**Marcha. Fase presuntiva.**

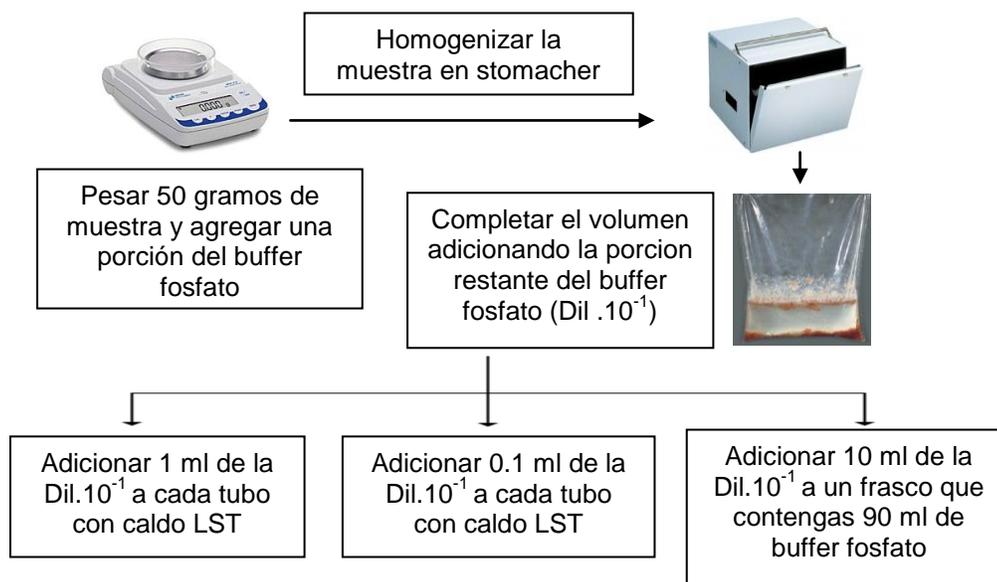
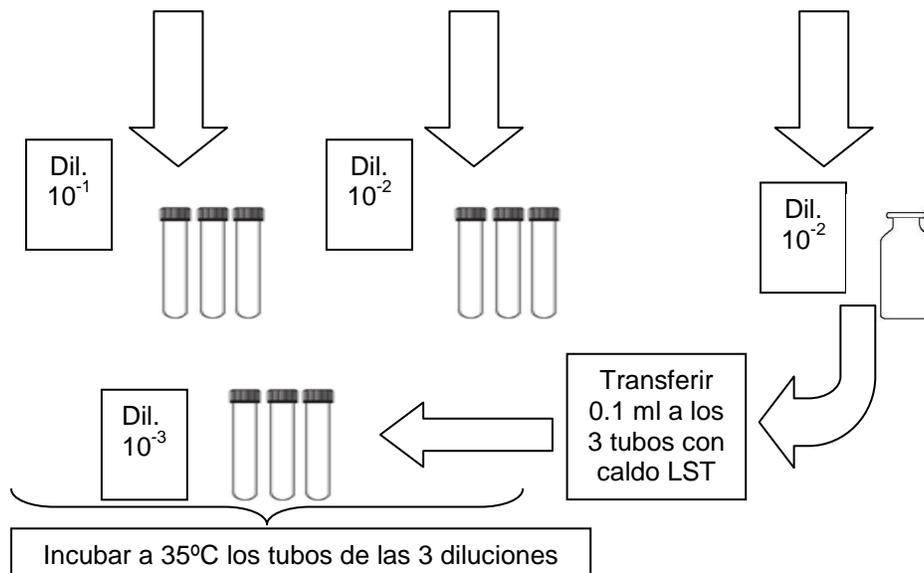


Figura N°8. Esquema de la fase presuntiva de Determinación de *Escherichia coli*, bacterias Coliformes



Continuación de Figura N°8.

Examinar los tubos a las 24 h, los que estén turbios y con formación de gas, continuar con la fase confirmativa y los que no, dejarlos por otras 24 h mas, si a las 48h finales los tubos resultan sin producción de gas ni turbidez, significa que no hay contaminación de coliformes y se reporta según la tabla.

**PRUEBA POSITIVA: crecimiento con producción de gas**

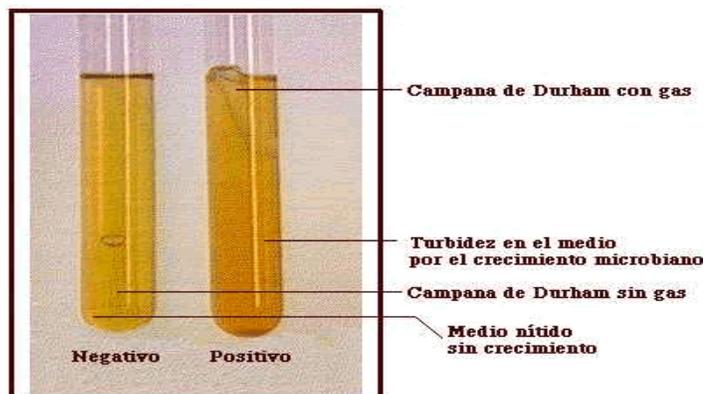


Figura N°9. Controles positivos y negativos de tubos con LST

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 17 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión:0

### Fase confirmativa para coliformes totales

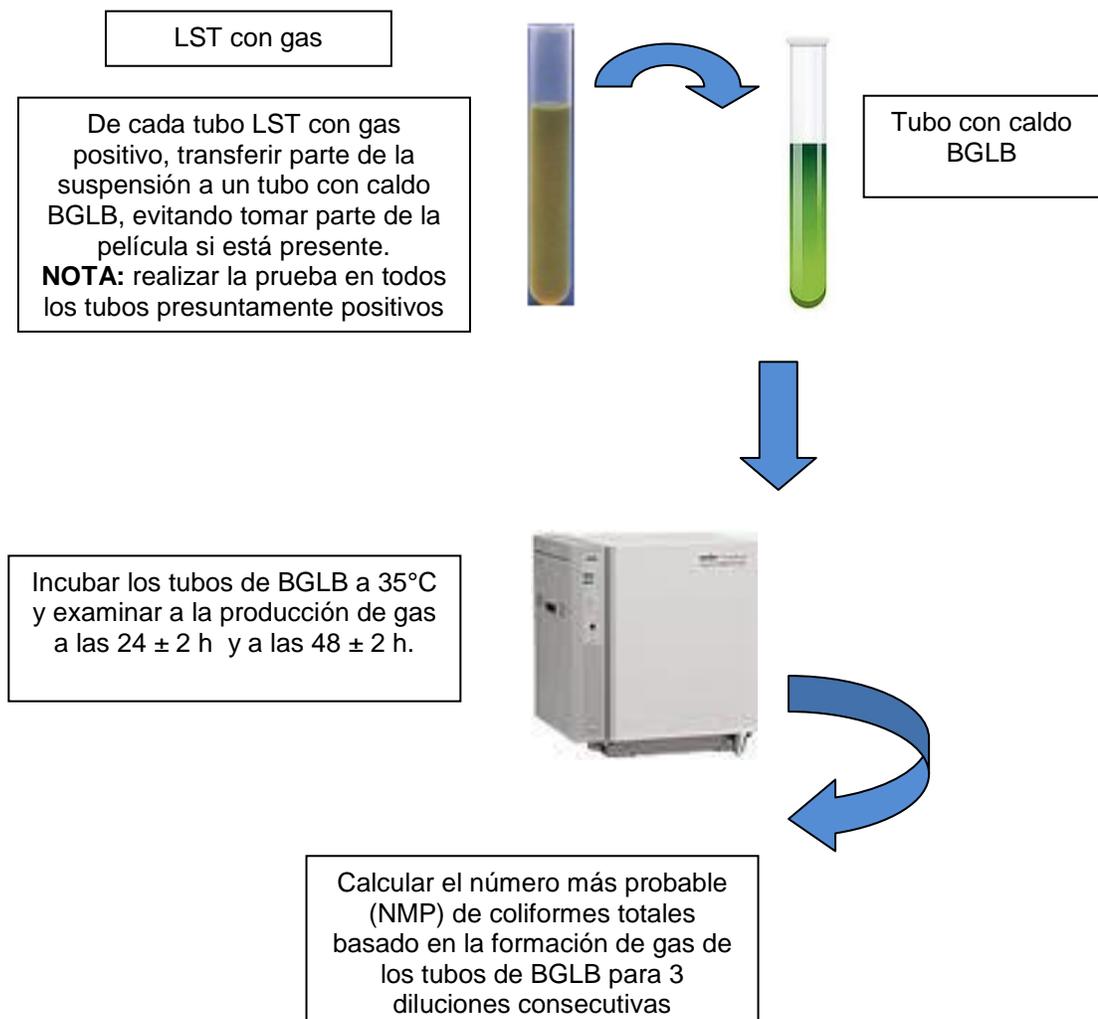


Figura N°10. Esquema de la fase confirmativa para bacterias Coliformes totales

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 18 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión:0

### Fase confirmativa para coliformes fecales y *Escherichia coli*

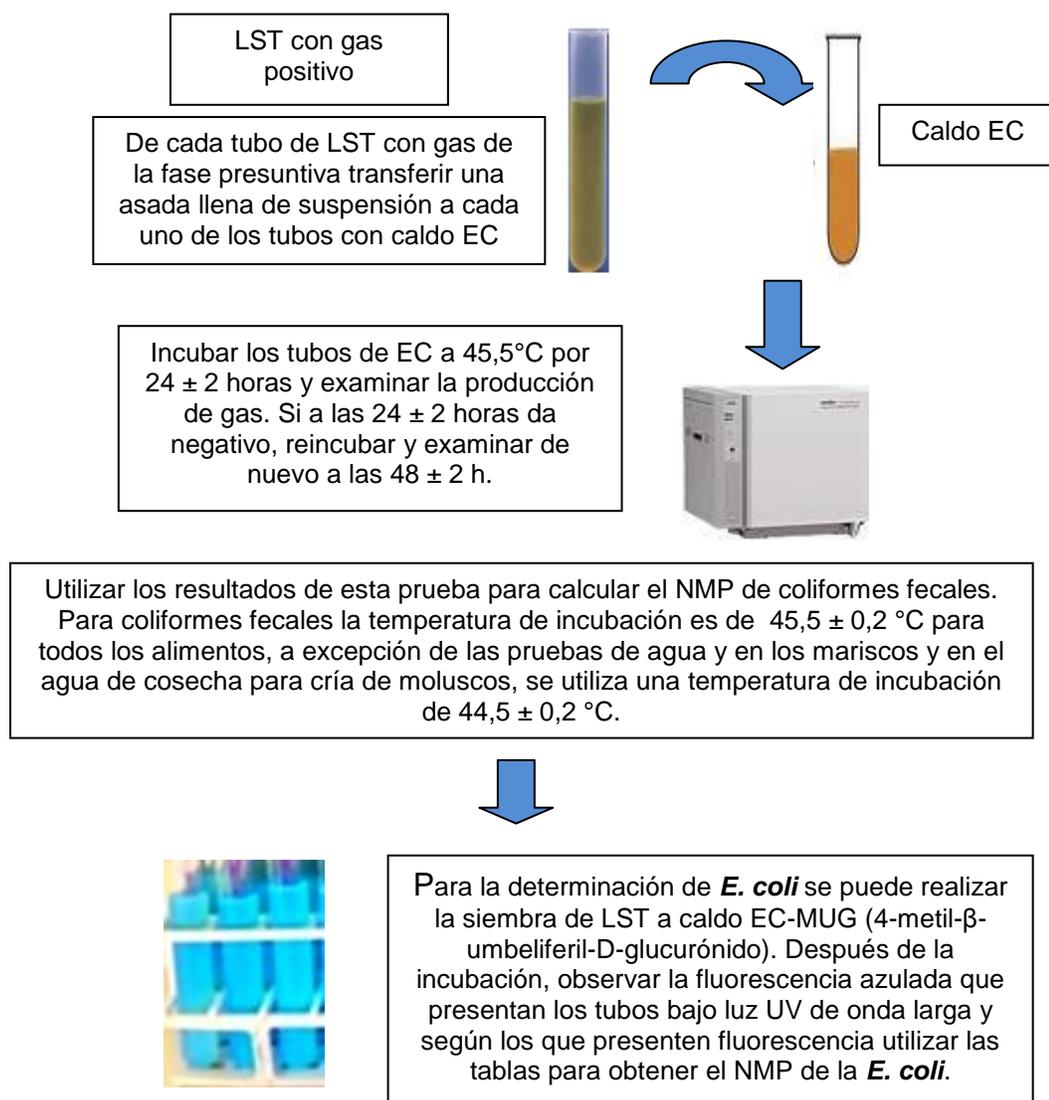


Figura N°11. Esquema de la fase confirmativa para coliformes fecales y *Escherichia coli*

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 19 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Versión:0

### Fase completa para la determinación de *E. coli* (Fase presuntiva)

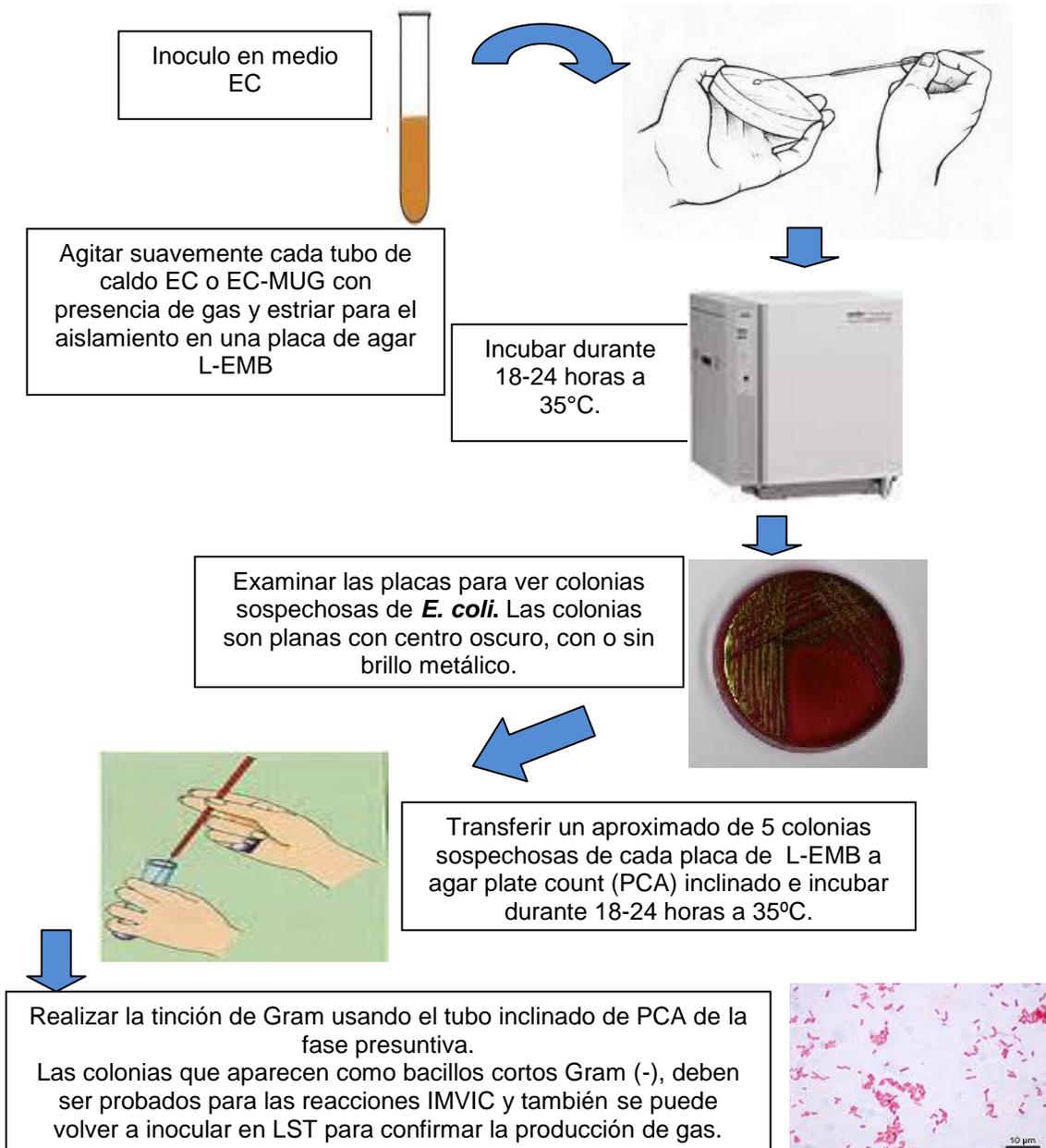


Figura N°12. Esquema de la fase presuntiva para la determinación de *Escherichia coli*

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 20 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Version:0

### Fase completa para la determinación de *E. coli*. (Fase confirmativa)

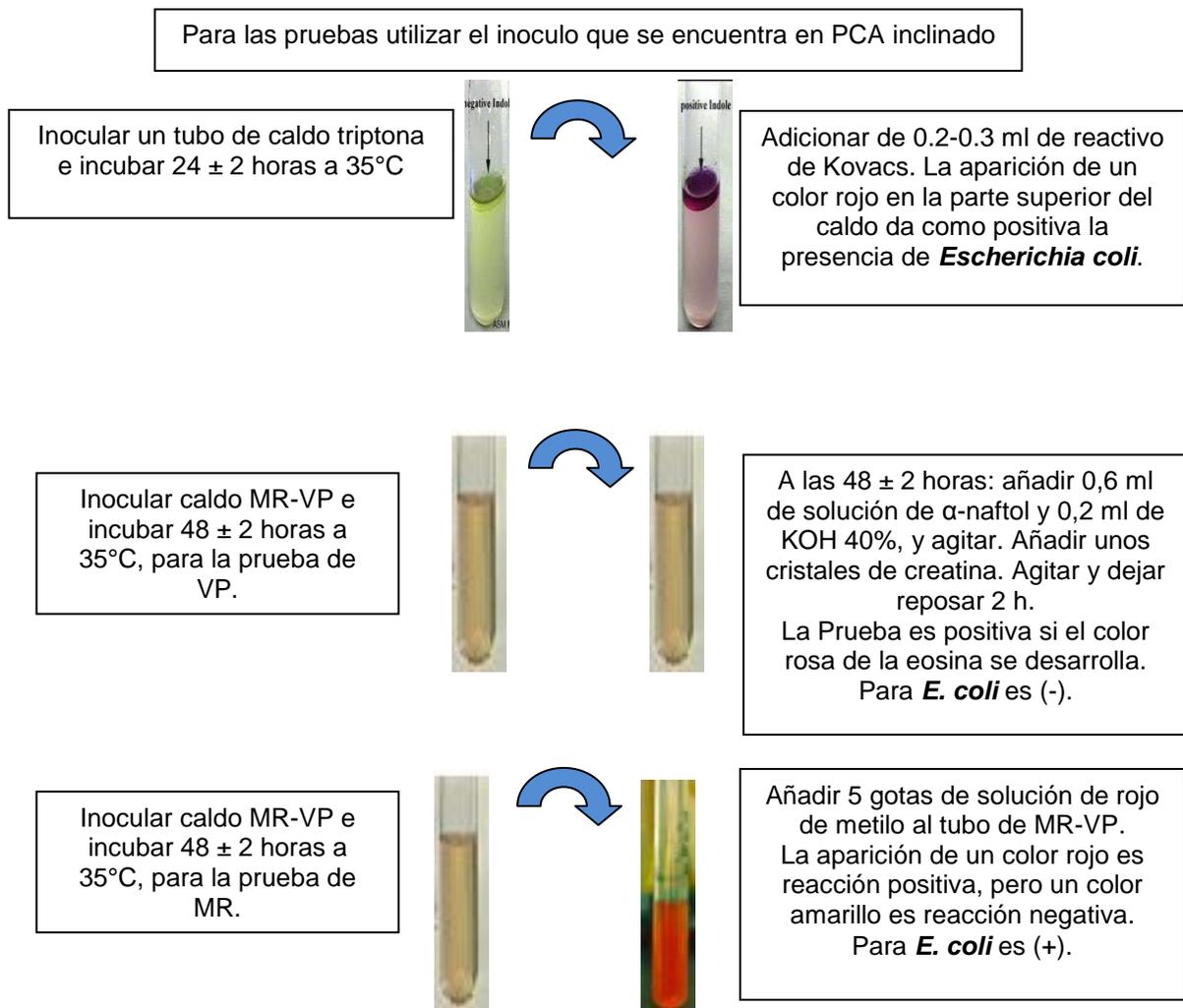
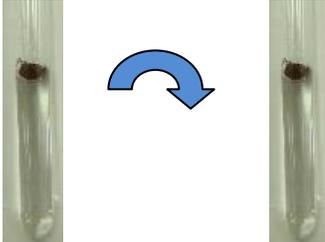


Figura N°13. Esquema de la fase confirmativa para la determinación de *Escherichia coli*

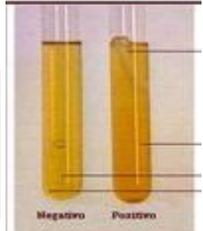
	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 21 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Version:0

Inocular ligeramente el tubo de caldo citrato de Koser; pero evitar la turbidez detectable.



Incubar durante 96 horas a 35°C.  
El desarrollo de la turbidez distinta a la de la inoculación es reacción positiva. Para *E. coli* es (-)

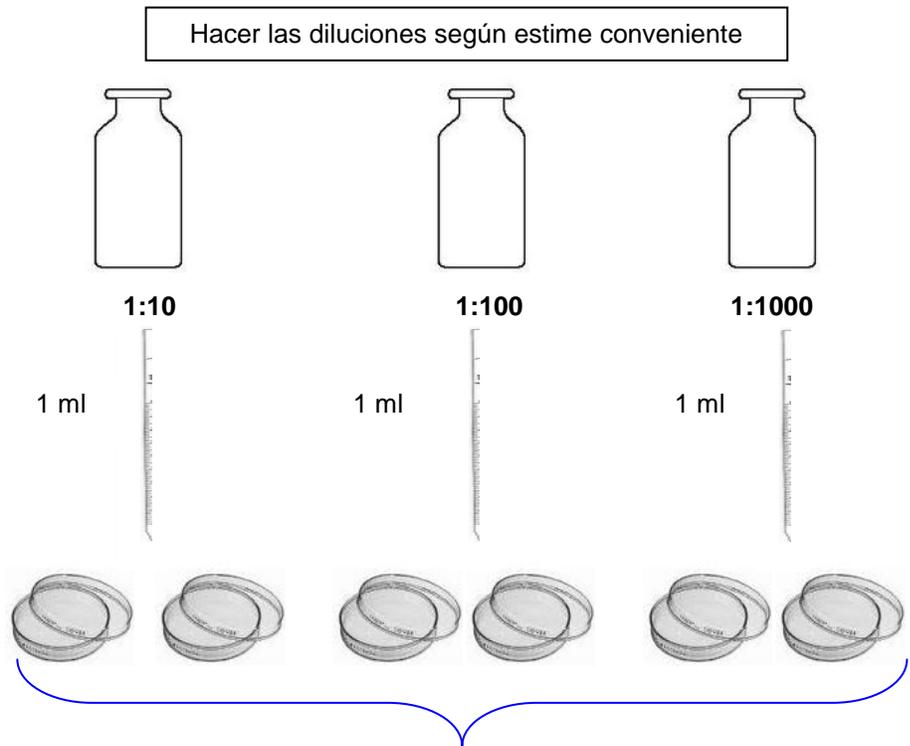
Inocular un tubo de LST e incubar 48 ± 2 horas a 35°C



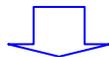
La producción de gas es reacción +. **Interpretación:** Todas las colonias que al fermentar la lactosa producen gas dentro de 48 horas a 35°C, que son bacilos Gram(-) y en las pruebas resultan con un IMVIC: + + - - (biotipo 1) o - + - - (biotipo 2), Son *E. coli*. Como alternativa, en lugar de IMVIC, se puede utilizar API 20 E para identificar la *E. coli*

Continuación de Figura N°13

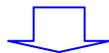
	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 22 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Version:0



Agregar un aproximado de 15 ml de medio VRBA a una temperatura aproximadamente de 48°C en cada placa, Mezclar en forma de 8 y dejar solidificar.



Invertir las placas e incubar por 18-24 horas a 35 °C



Examinar las placas en un cuenta colonias. Contar todas las colonias que están presentes en las placas ya que en este medio crecen las Enterobacterias. Para poder contar las placas debe de tener una carga de 25 a 250 colonias



Para confirmar que las colonias son coliformes picar por lo menos 10 colonias de cada placa y transferirlas a tubos con caldo BGLB. Incubar los tubos a 35°C, examinar a las 24 y 48 h para la producción de gas.

Figura N°14. Esquema para la cuantificación de Enterobacterias

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 23 de 23
	Determinación y Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias	Version:0

Si se desea determinar la presencia de coliformes fecales y *E. coli* hacer lo mismo que los primeros tres pasos. Invertir las placas e incubar por 18-24 horas a 45°C. Las colonias de *E. coli* se pueden distinguir entre las colonias de coliformes fecales en VRBA añadiendo 100 g de MUG por ml en la superposición VRBA. Después de la incubación, observar la fluorescencia azulada alrededor de las colonias bajo luz UV de onda larga.

Continuación de Figura N°14

Tabla N°2. NMP por gramo 95 por ciento de confianza por 3 tubos de cada uno de 0,1, 0,01 y 0,001 g de inóculos <sup>(5)</sup>

Pos. tubos			NMP / g	Conf. Lim.		Pos. tubos			NMP / g	Conf. Lim.	
0.10	0.01	0.001		Bajo	Alto	0.10	0.01	0.001		Bajo	Alto
0	0	0	<3,0	-	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	> 1100	420	-

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 1 de 12
	Determinación <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Version:0

## 1. Objetivo

Describir el método de presencia o ausencia de *Escherichia coli* O157:H7 en productos cárnicos crudos (empacados y sin empacar). No incluidas materias primas.

## 2. Alcance

Esta metodología es aplicable al alimento a la cual se le desee determinar la presencia o ausencia de la *Escherichia coli* O157:H7.

## 3. Descripción y resumen del método <sup>(5)</sup>

Hay muchos serotipos de *Escherichia coli* pero sólo aquellos que han sido clínicamente asociada con HC se designan como enterohemorrágica *Escherichia coli* (EHEC). De estos, la *Escherichia coli* O157: H7 es el prototipo y el más frecuentemente implicado en todo el mundo la enfermedad. La dosis infecciosa para la *Escherichia coli* O157: H7 se estima en 10 a 100 células. Infecciones por ECEH son en su mayoría de alimentos o agua contaminada y han implicado carne molida mal cocida, la leche cruda, bocadillos fríos, agua, jugo de manzana sin pasteurizar y las coles y verduras.

La ECEH O157: H7 es fenotípicamente diferente de *Escherichia coli* en el que muestran la fermentación lenta o no de sorbitol y no tienen actividad glucuronidasa, por lo que estos rasgos son a menudo utilizados para aislar el patógeno de los alimentos.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 2 de 12
	Determinación <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Version:0

#### 4. Materiales y equipo

1. Cuchillos, espátulas, pinzas, tijeras, estériles.
2. Bolsas estériles whirl pak.
3. Pipetas estériles graduadas de 1,0 y 10,0 ml
4. Placas petri estériles.
5. tubos con tapón de rosca.
6. Asa metálica en aro y en punta.
7. Balanza con capacidad de 2000 g de peso y sensibilidad de 0,1 g
8. Stomacher.
9. Incubadora de  $35 \pm 1,0$  °C y a  $42$  °C  $\pm 1$  °C.

#### 5. Reactivos y medios de cultivo

1. Agua peptonada tamponada modificada con piruvato (mBPWp) y Suplemento acriflavina-cefsulodina vancomicina(ACV)
2. Tellurito Cefixima - Agar MacConkey mas Sorbitol (TC-SMAC)
3. Agar selectivo cromogénico:
  - a. Agar R & F<sup>®</sup> *Escherichia coli* O157: H7.
  - b. Agar Arco iris<sup>®</sup> O157.
4. Eosina-azul de metileno de Levine (L-EMB) agar (Sección I solamente)
5. Agar tripticasa soya con extracto de levadura (TSA+EY).
6. Butterfield fosfato Tamponado (pH  $7,2 \pm 0,2$ . estéril)
7. De agua destilada estéril, molecular agua de grado o equivalente
8. Solución salina fisiológica (0,85% de NaCl)
9. Reactivo de Kovac

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 3 de 12
	Determinación <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Version:0

10. Discos ColiComplete - contiene sustrato MUG fluorogénico de GUD y cromogénico X-gal para GAL (BioControl, Bellevue, WA)

11. Anti-O157-H7 y anti-reactivo de látex (Remel, Lenexa, KS, o su equivalente)

12. API 20 E

## 6. Procedimiento <sup>(5)</sup>

Preparación de la muestra

- Pesar 25 g del alimento, adicionar 225 ml de mBPWp y mezclar en Stomacher.

Enriquecimiento.

- Incubar a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 horas, luego, añadir 1 ml de cada uno de los suplementos de ACV.

- Incuba a  $42\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 18-24 horas.

Aislamiento.

- De la muestra enriquecida aislar por el método de estrías, en agar TC-SMAC y en un agar cromógeno (agar arco Iris <sup>®</sup> O157 o R & F <sup>®</sup>, agar de *Escherichia coli* O157: H7).

- Incubar las placas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 h.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 4 de 12
	Determinación <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Version:0

En agar TC-SMAC las colonias típicas de la *Escherichia coli* serotipo O157:H7 son incoloras o neutrales / grises con un centro lleno de humo y 1-2 mm de diámetro. La fermentación del sorbitol, como la mayoría de las bacterias *Escherichia coli* aparecen como colonias de color rosa a rojo. Ver Figura N° 16.

En Agar Arco Iris® O157 o Agar R & F® *Escherichia coli* O157:H7, las colonias de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 son de color negro a azul-negro. Ver Figura N° 16.

- Seleccionar las colonias sospechosas y típicas de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 y aislarlas en tres placas de agar TSA+EY por el método de estrías.
- Incubar dos de ellas durante un periodo de 18-24 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y la otra dejarla para la prueba de disco CC.
- De igual forma, estriar en una placa de TSA+EY, un tipo de *Escherichia coli* que sea MUG positivo.
  - Colocar un disco ColiComplete (CC) en el área en que se espera mayor crecimiento en una de las placas que contiene el aislamiento sospechoso de la *Escherichia coli* serotipo O157:H7 y en la placa estriada con la *Escherichia coli* MUG positivo.
- Incubar las placas durante un periodo de 18-24 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Ver Figura N° 17.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 5 de 12
	Determinación <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Version:0

NOTA: El disco CC tiene un ensayo cromogénico para galacto piranosidasa (X-gal) y un ensayo fluorogénico para glucuronidasa (MUG) en el mismo disco.

El control positivo debe mostrar un color azul y en todo el disco (indicativo de coliformes) y fluorescencia azul alrededor del disco bajo la luz ultravioleta de onda larga (365 nm) (indicativo de *Escherichia coli*). Ver Figura N° 18.

Las cepas de *Escherichia coli* serotipo O157: H7 son X-gal (+), pero MUG (-).

#### Prueba de Indol

- Colocar un filtro humedecido con el reactivo de Kovac en una de las dos placas de TSA+EY previamente incubadas que contienen el crecimiento de colonias sospechosas y típicas de *Escherichia coli* serotipo O157: H7.

- Resultado: La *Escherichia coli* serotipo O157: H7 es Indol positivo. Ver Figura N° 19.

#### Pruebas de confirmación

- Para las colonias típicas que han demostrado ser de X-gal positivas, MUG negativas e Indol positivo, realizar las siguientes pruebas de confirmación a partir de las colonias aisladas en la placa de agar TSA+EY.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 6 de 12
	Determinación <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Version:0

Confirmar la presencia de los antígenos O157 y H7 utilizando antisueros comerciales y siguiendo las instrucciones del fabricante. Ver Figura N° 20.

NOTA: Si el aislado es O157 y H7 positivo, es evidencia de que el aislado es del serotipo O157: H7. Sin embargo, si el aislamiento es O157 (+), pero H7 (-), ya que puede ser una variante no móviles (O157: NM).

El aislado también se puede subcultivar en agar sangre para inducir la motilidad y ensayar la reacción H7.

Precaución: Asegúrese de probar el aislamiento con el látex de control suministrado con el kit, para descartar la posibilidad auto aglutinante de cepas de *Escherichia coli* que reaccionan con ambos reactivos. Además, no utilice H7 reactivo de látex sin probar primero con el reactivo O157 como otros tipos de serotipos de *Escherichia coli* no-O157 también puede llevar el antígeno H7.

**7. Formulario de calidad.** Ver página N° 177.

### Preparación de la muestra



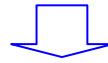
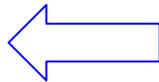
Pesar 25 g del alimento y adicionar 225 ml de mBPWp.



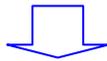
Mezclar en Stomacher.

Figura N°15. Esquema para la Determinación *Escherichia coli* O157:H7

### Enriquecimiento



### Aislamiento



TC-SMAC



Agar Rainbow



R&F *E.coli* O157:H7



Incubar las placas a 37 ° C ± 1 ° C durante 18 a 24 h.



Las colonias típicas de *E. coli* O157:H7 en agar TC-SMAC son incoloras o neutral / gris con un centro lleno de humo y miden de 1-2 mm de diámetro. La fermentación del sorbitol, como la mayoría de las bacterias *E. coli* aparecen como colonias de color rosa a rojo.  
 En agar Arco Iris O157 o R & F *E. coli* O157: H7, las colonias de *E. coli* O157: H7 aparecen de color negro a azul-negro.

Continuación de Figura N°15



TSA+EY

TSA+EY

TSA+EY

Seleccionar las colonias sospechosas y típicas de *E. coli* O157:H7 de las placas incubadas anteriormente y aislarlas en tres placas de agar TSA+EY por el método de estrias.

Incubar dos de ellas durante un periodo de 18-24 horas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y la otra dejarla para la prueba de disco CC.



De igual forma, estriar en una placa de TSA+EY, un tipo de *E. coli* que sea MUG positivo.



Colocar un disco ColiComplete (CC) en el área que se espera mayor crecimiento de la placa reservada para la prueba de disco CC, que contiene el aislamiento sospechoso de la *E. coli* O157: H7, y colocar un disco CC en la placa estriada en TSA+EY con *E. coli* MUG positivo.

Continuación de Figura N°15

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 9 de 12
	Determinación <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Version:0

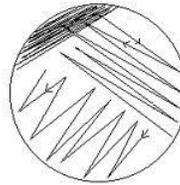
Incubar las placas durante un periodo de 18-24 horas a 37 °C ± 1 °C.



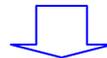
El disco CC tiene un ensayo cromogénico para galactopiranosidasa (X-gal) y un ensayo fluorogénico para glucuronidasa (MUG) en el mismo disco. El control positivo debe mostrar un color azul y en todo el disco (indicativo de coliformes) y fluorescencia azul alrededor del disco bajo la luz ultravioleta de onda larga (365 nm) (indicativo de *E. coli*). Las cepas de *E. coli* O157: H7 son X-gal (+), pero MUG (-).

### Prueba de Indol

Crecimiento de colonias sospechosas y típicas de *E.coli* O157:H7 en TSA+EY

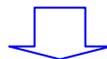


Colocar un filtro humedecido con el reactivo de Kovac en una de las dos placas de TSA+EY previamente incubadas que contienen el crecimiento de colonias sospechosas y típicas de *E. coli* O157: H7  
 Resultado: la *Escherichia coli* serotipo O157: H7 es Indol positivo.



### Pruebas de confirmación

Para las colonias típicas que son X-gal (+), MUG (-) e Indol (+), realizar las pruebas de confirmación a partir de las colonias aisladas en agar TSA+EY.



Continuación de Figura N°15

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 10 de 12
	Determinación <i>Escherichia coli</i> O157:H7	Version:0

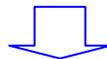
Confirmar la presencia de los antígenos O157 y H7 utilizando antisueros comerciales, da resultados positivos.



**NOTA:**

Si el aislado es O157 y H7 (+), es evidencia de que el aislado es del serotipo O157:H7.

Sin embargo, si el aislamiento es O157 (+), pero H7 (-), siga los pasos de confirmación por debajo, ya que puede ser una variante no móvil (O157:NM), por lo tanto tiene que ser probado por PCR para determinar su potencial toxigénico.



El aislado también se puede subcultivar en agar sangre para inducir la motilidad y la reacción H7 ensayarse.

Precaución: Asegúrese de probar el aislamiento con el látex de control suministrado con el kit, para descartar la posibilidad autoaglutinante de cepas de *E. coli* que reaccionan con ambos reactivos. Además, no utilice H7 reactivo de látex sin probar primero con el reactivo O157 como otras organizaciones no-O157 serotipos de *E. coli* también puede llevar el antígeno H7.

Continuación de Figura N°15

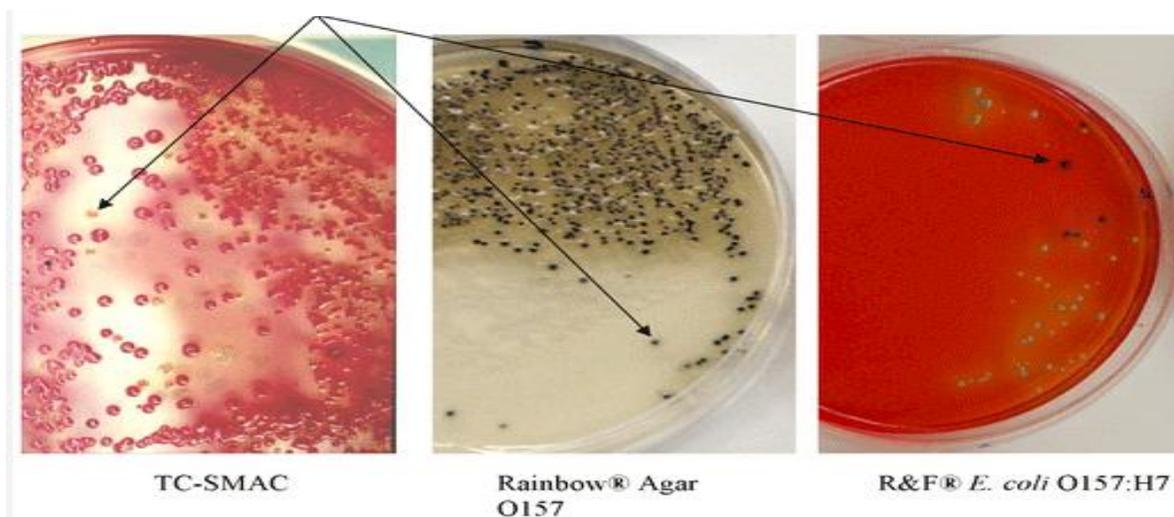


Figura N°16. Colonias características de *Escherichia coli* O157:H7

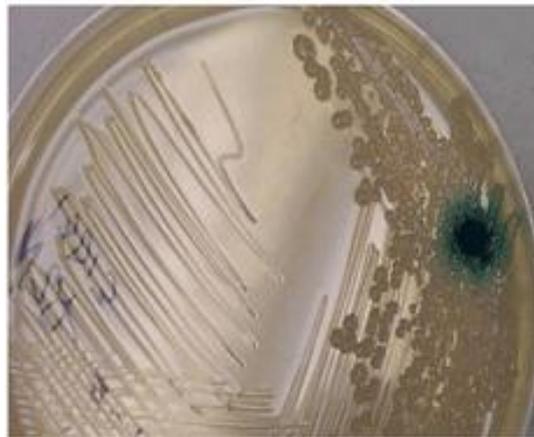


Figura N°17. Reacción característica de X-gal para coliformes

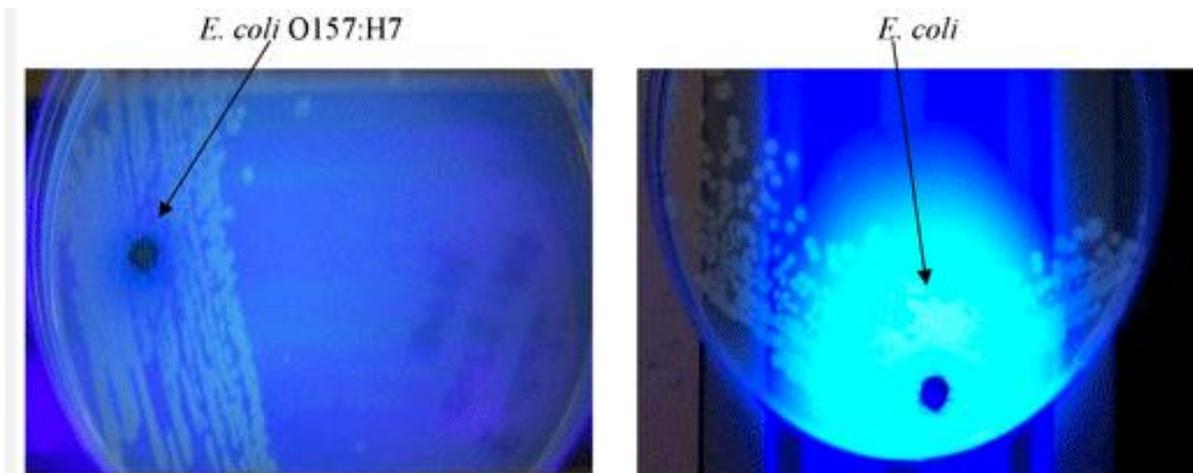


Figura N°18. Prueba de MUG positiva y negativa.



Figura N° 19. Prueba de Indol Reacción positiva.

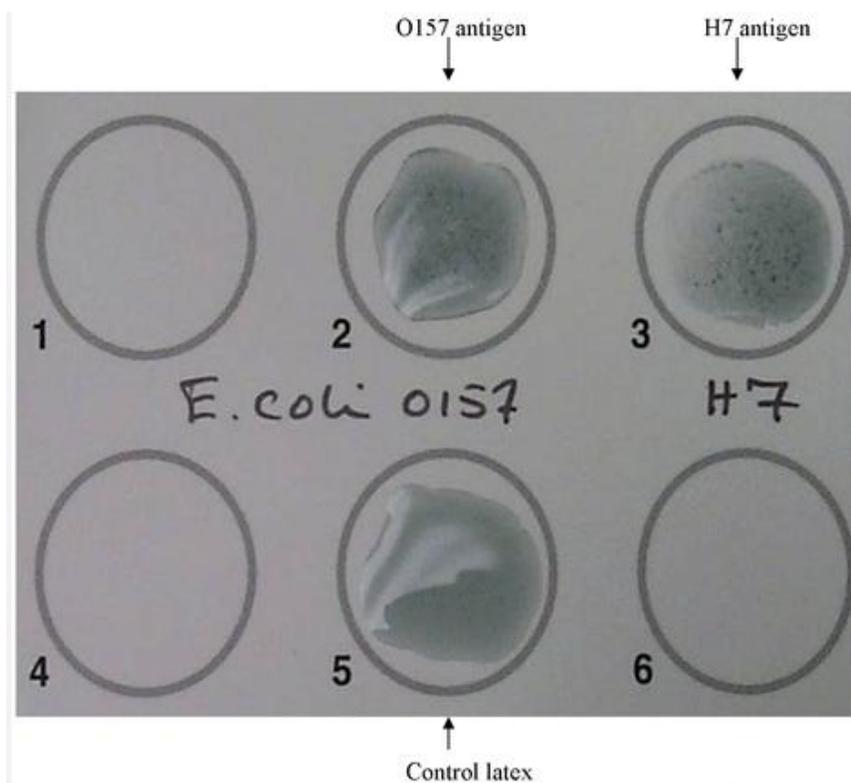


Figura N° 20. Prueba de látex.

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA	Pagina 1 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

## 1. Objetivo

Describir el método de presencia/ ausencia de *Salmonella spp* en leche y productos lácteos; grasa, aceites y emulsiones grasas; frutas y hortalizas; productos de confitería; cereales y derivados; pan, productos de panadería y pastelería; carnes y productos cárnicos; pescado, derivados y productos marinos; huevos y derivados; salsas, aderezos, especias y condimentos; alimentos para usos nutricionales especiales; bebidas no alcohólicas sin incluir el agua envasada; bocadillos; caldos, sopas, cremas y mezclas deshidratadas; alimentos listos para consumir.

## 2. Alcance

Esta metodología aplica a todo tipo de muestra alimentaria para la cual se le desee determinar la *Salmonella spp*.

## 3. Descripción y resumen del método <sup>(5)</sup>

El método se basa en el análisis de 25 g de muestra, los cuales se pre enriquecen para favorecer el crecimiento de las bacterias presentes, luego de este pre enriquecimiento se traslada de este a medios selectivos y diferenciales con el objetivo de obtener colonias características y típicas de *Salmonella spp*.

## 4. Materiales y equipo

1. Cucharas estériles.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 2 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

2. Bolsas de plástico estériles de 28 x 37 cm, con cinta de cierre.
3. Placas de Petri estériles.
4. Pipetas estériles de 1 ml (0,01 ml), 5 y 10 ml, con 0,1 ml de graduación.
5. Papel pH con un rango entre 6 – 8
6. Asa de inoculación en aro y en punta.
7. Vortex.
8. Balanza con capacidad de 2000 g
9. Incubadora a  $35 \pm 2$  °C.
10. Baño de agua con termostato a  $43 \pm 0.2$  °C ;  $42 \pm 0.2$  °C y  $49 \pm 1$  °C.

## 5. Reactivos y medios de cultivo

1. Solución de papaína al 5%
2. Solución de Celulosa al 1%
3. Solución de cloro a 200 ppm que contiene 0,1% de sodio dodecil sulfato
4. Solución de hidróxido de potasio al 40%
5. Solución de hidróxido sódico 1N
6. Acido clorhídrico 1N
7. Solución colorante verde Brillante al 1%
8. Agua destilada estéril
9. Tergitol aniónicos 7
10. Triton X-100
11. Solución salina fisiológica, 0,85% (estéril)
12. Solución salina fisiológica Formalinizada
13. Antisuero (H), *Salmonella* polivalente flagelar
14. Leche en polvo sin grasa (reconstituido)

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 3 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

15. Caldo Lactosado
16. Caldo Tripticasa (tríptico) de soya
17. Caldo Tetrionato (TT)
18. Rappaport-Vassiliadis (RV)
19. Agar Xilosa lisina desoxicolato (XLD)
20. Agar Hektoen entérico (HE)
21. Agar Bismuto sulfito (BS)
22. Triple azúcar hierro agar (TSI)
23. Lisina hierro agar (LIA)
24. Caldo Tripticasa de soya con sulfato ferroso
25. Caldo Tripticasa de soya-triptosa
26. Caldo Urea
27. Medio de ensayo Movilidad (semisólido)
28. Caldo nutritivo
29. Caldo Infusión cerebro corazón (ICC) o Brain heart infusion (BHI)
30. Caldo Universal de pre-enriquecimiento

## 6. Procedimiento <sup>(5)</sup>

### A. Preparación de alimentos para el aislamiento de *Salmonella spp.*

Los siguientes métodos se basan en el análisis de 25 g de la unidad analítica a una relación de 1: 9 muestra/caldo. Depende de lo extenso de la composición, añada suficiente caldo para mantener esta relación 1:9 a menos que se indique de otra manera.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 4 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

Para muestras no analizadas sobre una base exacta de peso, ej. Ancas de rana, referirse al método específico para instrucciones.

- 1. Yema de huevo desecada, clara de huevo, huevo entero desecado, leche líquida (leche entera, leche con 2% de grasa, leche descremada, nata de leche), mezclas preparadas en polvo (pastel, panque, galleta, bollos, bizcocho, y pan), formulas infantiles, alimentos para alimentación oral o tubo conteniendo huevo.**

Si la muestra está congelada debe descongelarse por debajo de 45°C por 15 minutos con agitación constante en baño de agua o durante 18 horas a 25°C.

Pese asépticamente 25 g de muestra dentro de una bolsa estéril. Si la muestra no está en polvo, agregue 225 ml de caldo lactosado estéril y homogenice. Si el producto está pulverizado, agregue 15 ml de caldo lactosado estéril y mezcle con un agitador de vidrio, cuchara estéril para suavizar la suspensión. Agregue 3 porciones de 10, 10, 190 ml de caldo para completar 225 ml.

Mezcle hasta que la mezcla quede suspendida sin grumos.

Asegurar el cierre y deje reposar 60 minutos a temperatura ambiente.

Mezcle bien por rotación, determine el pH con papel de prueba y ajústelo si es necesario a  $6.8 \pm 0.2$  con NaOH 1N o HCl 1N estériles.

Cierre y mezcle bien antes de determinar el pH final y continúe desde B.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 5 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

## 2. Huevos:

**a) Cascara de huevo:** lave los huevos con un cepillo y escúrralos. Enjabone con una solución conteniendo 0.1% de sulfato de sodio dodecilico (SDS) por 30 minutos. Prepare 200 ppm de solución SDS en cloro al 0.1% añadiendo 8 ml de lejía comercial (5-25% de hipoclorito de sodio) a 992 ml de agua destilada conteniendo 1g de SDS. Prepare antes del análisis. Quiebre los huevos asépticamente dentro de un contenedor estéril y lentamente mezcle las claras con las yemas con una cuchara estéril u otro instrumento.

Pese asépticamente 25 g de muestra en una bolsa estéril. Añada 225 ml de Caldo Trypticasa Soya suplementado con Sulfato Ferroso. (35 mg de sulfato ferroso, se añaden a 1000 ml de caldo) y mezcle bien.

Deje en reposo  $60 \pm 5$  min. A temperatura ambiente, mezcle bien y determine el pH con papel. Ajuste si es necesario a  $6.8 \pm 0.2$ . Deje un poco flojo el cierre de la bolsa e Incube a  $24 \pm 2$  horas a  $35^\circ\text{C}$  y continúe desde B.

**b) Huevos enteros líquido (homogenizado):** pese 25 g de muestra en una bolsa estéril. Añada 225 ml de caldo tripticasa de soya suplementado con sulfato ferroso y mezcle bien. Continúe como se describe en a).

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 6 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

**c) Huevos cocidos (pollo, pato y otros)** si la cascara del huevo ha permanecido intacta, desinféctela como se describe arriba y asépticamente separe la cascara del huevo, pulverice los huevos (yema y clara solidas) asépticamente y pese 25 g de muestra en una bolsa estéril. Añada 25 ml de caldo tripticasa soya con sulfato ferroso y mezcle bien. Continúe como se describe en a).

### 3. Leche en polvo descremada

**a) Instantánea.** Pese asépticamente 25 g de muestra y añada 225 ml de agua verde brillante estéril. Prepare el agua verde brillante añadiendo 2 ml de solución tintura verde brillante al 1% por 1000 ml de agua destilada estéril.

Dejar en reposo por  $60 \pm 5$  minutos. Deje un poco flojo el cierre de la bolsa e incube por  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Continúe desde B.

**b) No instantánea:** proceda como se describe en a).

**4. Leche en polvo entera:** proceda como se describe en a).

### 5. Caseína

**a) Caseína láctica.** Pese asépticamente 25 g de muestra y vierta lentamente 225 ml de caldo universal preenriquecido. Mezclar y dejar en reposo por  $60 \pm 5$  min. Deje un poco flojo el cierre de la bolsa e incube

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 7 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

sin mezclar o ajuste el pH, por  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Continúe desde B.

**b) Caseína Rennet:** pese asépticamente 25 g y proceda como se describe en a) a excepción que se utilizan 225 ml de caldo lactosado.

**c) Caseína de sodio:** pese asépticamente 25 g de muestra en una bolsa estéril. Añada 225 ml de caldo lactosado y mezcle bien.

Dejar en reposo por 60 minutos a temperatura ambiente con la bolsa bien cerrada. Mezcle bien y determine el pH con papel pH. Ajuste el pH si es necesario a  $6.8 \pm 0.2$ . Deje un poco flojo el cierre de la bolsa e incube  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Continúe desde B.

**6. Harina de soya:** proceda como se describe para caseína láctica y caseína Rennet excepto que los 25 g de muestra no deben mezclarse.

**7. Productos conteniendo huevos (tallarines, fideos, rollos de huevo, macarrones, espagueti), pastas, ensaladas preparadas (jamón, huevo, pollo, tuna, pavo), frutas y vegetales desecados, frescos y congelados, harina de nuez, crustáceos (camarones, cangrejos, langostinos, langostas, cangrejo de rio), y pescado.**

Si la muestra está congelada debe llevarse a una temperatura ambiente para obtener la porción analítica, descongelando 18 horas de  $2-5^{\circ}\text{C}$ . Pese asépticamente 25 g de muestra en una bolsa estéril, agregue 225 ml de

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 8 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

caldo lactosado y homogenice por 2 minutos. Cierre la bolsa y deje reposar durante 60 minutos a temperatura ambiente. Mezcle bien por movimiento y determine el pH con papel de prueba.

Si es necesario ajuste el pH a  $6.8 \pm 0.2$ . Mezcle bien, deje un poco flojo el cierre de la bolsa e incube  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Continúe desde B.

#### **8. Levadura deshidratada (activa e inactiva).**

Pese asépticamente 25 g de muestra en bolsa estéril y agregue 225 ml de caldo tripticasa de soya. Mezcle bien para obtener una suspensión sin grumos. Deje en reposo 60 minutos a temperatura ambiente bien cerrado.

Mezcle bien, determine el pH con papel pH y si es necesario ajuste el pH a  $6.8 \pm 0.2$ . Deje un poco flojo el cierre de la bolsa e incube  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$  para levadura inactiva, continúe desde B.

#### **9. Turrón y mezclas para cubrir**

Pese 25 g de muestra en bolsa estéril y agregue 225 ml de caldo nutritivo y mezcle bien. Cierre la bolsa y deje reposar  $60 \pm 5$  minutos a temperatura ambiente. Mezcle, mida el pH y ajústelo si es necesario a  $6.8 \pm 0.2$ . Deje un poco flojo el cierre de la bolsa e incube  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Continúe desde B.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 9 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

## 10. Especies

- a) Pimienta de castilla (pimienta negra), pimienta blanca, trozos o semillas de apio, chile, comino, pimentón, perejil, romero, ajonjolí, tomillo y vegetales en trozos u hojuelas.**

Pese 25 g de muestra en bolsa estéril, agregue 225 ml de caldo tripticasa de soya y mezcle bien. Cierre la bolsa y deje reposar 60 minutos a temperatura ambiente, mezcle, determine el pH con papel pH y ajuste si es necesario a  $6.8 \pm 0.2$ . Deje un poco flojo el cierre de la bolsa e incube  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Continúe desde B.

- b) Cebolla en hojuelas, en polvo, ajo en hojuelas.**

Pese asépticamente 25 g de muestra en bolsa estéril. Pre enriquezca la muestra en caldo tripticasa soya añadiendo  $\text{K}_2\text{SO}_3$  (5g  $\text{K}_2\text{SO}_3$  por 1000 ml de tripticasa soya resultando al final una concentración de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  al 0.5%). Añada  $\text{K}_2\text{SO}_3$  al caldo antes de autoclavar, en volumen de 225 ml a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

Después de autoclavar asépticamente determine y si es necesario, ajuste el volumen final a 225 ml. Añada los 225 ml de caldo con  $\text{K}_2\text{SO}_3$  a la muestra y mezcle bien. Continúe como sigue en literal a).

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 10 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

### c) Pimiento, canela, clavo y orégano

Hasta este momento no se conocen métodos para neutralizar la toxicidad de estas cuatro especias. Deben diluirse hasta que sus niveles de toxinas les permita analizarlas. El pimiento, la canela y el orégano se diluyen en una relación 1:100 muestra/caldo y el clavo a 1: 1000.

Examine los condimentos gruesos a una relación mayor de 11:10 muestra/caldo, debido a la dificultad de absorberse en el caldo. Examine cómo se describe en el literal a), manteniendo las relaciones muestra/caldo recomendadas.

### 11. Dulces y recubrimientos dulces (incluido el chocolate).

Pese asépticamente 25 g de muestra en bolsa estéril, añada 225 ml de leche en polvo descremada reconstituida y mezcle 2 minutos. Cierre bien la bolsa y deje en reposo  $60 \pm 5$  minutos a temperatura ambiente. Mezcle bien y determine el pH con papel prueba. Ajuste el pH si es necesario y mezcle bien. Deje un poco flojo el cierre de la bolsa e incube  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Continúe desde B.

### 12. Coco.

Pese asépticamente 25 g de muestra en bolsa estéril. Añada 225 ml de caldo lactosado estéril, mezcle bien, determine pH con papel de prueba.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 11 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

Ajuste el pH si es necesario a  $6.8 \pm 0.2$ .

Añada tritón tergitol aniónico previamente calentando (15 minutos).

Para el tritón X-100, esta cantidad debe ser por lo menos 2 a 3 gotas.

Deje un poco flojo el cierre de la bolsa e incube 24 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Continúe desde B.

### **13. Tinturas y colorantes para alimentos.**

Para tinturas con pH 6.0 o más (suspensión acuosa al 10%) use el método descrito para huevo entero cocido. Para tinturas de laca o tinturas con pH debajo de 6.0, asépticamente pese 25 g de muestra en bolsa estéril. Añada 225 ml de caldo tetrionato sin tintura verde brillante, mezcle bien, cierre la bolsa y deje en reposo  $60 \pm 5$  minutos a temperatura ambiente, ajuste el pH a  $6.8 \pm 0.2$ . Añada 2,25 ml de solución de tintura verde brillante al 0.1% y mezcle completamente. Deje un poco flojo el cierre de la bolsa e incube por  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Continúe desde B.

### **14. Gelatina.**

Pese asépticamente 25 g de muestra en bolsa estéril. Añada 225 ml de caldo lactosado estéril y 5 ml de solución acuosa de papaína al 5% y mezcle bien. Cierre e incube a  $35^{\circ}\text{C}$  por  $60 \pm 5$  minutos.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 12 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

Mezcle bien y determine el pH con papel de prueba. Ajuste si es necesario a  $6.8 \pm 0.2$ . Deje un poco flojo el cierre de la bolsa e incube  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Continúe desde B.

**15. Carnes, sustitutos de carne, productos cárnicos, sustancias animales, productos glandulares y harinas (pescado, carnes, huesos).**

Pese asépticamente 25 g de muestra en bolsa estéril, añada 225 ml de caldo lactosado y mezcle 2 minutos. Cierre bien y Deje en reposo  $60 \pm 5$  minutos a temperatura ambiente. Si la mezcla es polvo, el mezclado puede omitirse. Para muestras que no requieran el mezclado, añada caldo lactosado y mezcle completamente; cierre bien y deje en reposo por  $60 \pm 5$  minutos a temperatura ambiente.

Mezcle bien y determine el pH con papel prueba. Ajuste el pH si es necesario a  $6.8 \pm 0.2$ . Añada arriba de 2,25 ml de tergitol aniónico 7 calentado 15 minutos y mezcle bien. Alternativamente use tritón X-100 calentado 15 minutos. Limite el uso de estos surfactantes para minimizar la cantidad requerida para iniciar la espuma.

La cantidad actual depende de la composición del material de prueba.

Los surfactantes no se necesitan en análisis de productos glandulares pulverizados.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 13 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

Deje un poco flojo el cierre de la bolsa e incube las muestras  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Continúe desde B.

**16. Ancas de ranas (este método se usa para ancas de ranas domesticas e importadas).**

Transfiera 15 partes de ancas de ranas en una bolsa plástica y cubra con caldo lactosado estéril a una relación muestra/caldo (g/ml) de 1:9.

Si el promedio de la muestra es de 25 g o más, examine solo una anca de cada una de los 10 pares. Mezcle bien y deje en reposo  $60 \pm 5$  minutos a temperatura ambiente. Mezcle bien y determine el pH con papel de prueba. Ajuste el pH si es necesario a  $6.8 \pm 0.2$ . Deje un poco flojo el cierre de la bolsa e incube  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Continúe desde B.

**17. Conejo descarnado (este método es usado para conejos descarnados domésticos e importados).**

Coloque el conejo en una bolsa plástica. Añada caldo lactosado estéril a una relación de 1:9 para cubrir la muestra. Mezcle bien y deje en reposo  $60 \pm 5$  minutos a temperatura ambiente. Mezcle bien y determine el pH con papel pH. Ajuste si es necesario a  $6.8 \pm 0.2$ . Incube  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Continúe desde B.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 14 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

### 18. “Goma Guar”

Pese asépticamente 25 g de muestra en bolsa estéril, prepare una solución de celulosa al 1% (añada 1 g de celulosa a 99 ml de agua destilada estéril) y dispense en frascos de 150 ml (la solución de celulosa debe almacenarse a 2.5°C por arriba de 2 semanas).

Añada 225 ml de caldo lactosado estéril a una bolsa, mientras se agita vigorosamente la mezcla lactosa/celulosa con agitador, coloque los 25 g de muestra rápido por medio de un embudo de vidrio. Cierre la bolsa y deje en reposo  $60 \pm 5$  minutos a T° ambiente. Incube con el cierre de la bolsa un poco flojo sin ajustar pH, por  $24 \pm 2$  horas a 35°C. Continúe desde B.

### 19. Jugo de naranja (pasteurizado y no pasteurizado), sidra de manzanas y jugo de manzana (pasteurizado y no pasteurizado).

Añada asépticamente 25 ml de muestra a 225 ml de caldo universal preenriquecido en bolsa estéril. Mezcle el contenido completamente. Tape bien y deje en reposo  $60 \pm 5$  minutos a temperatura ambiente. No ajuste pH. Incube con el cierre de la bolsa un poco flojo, por  $24 \pm 2$  horas a 35°C. Continúe desde B.

### 20. Orejas de puerco y otros tipos de bocadoillos.

Transfiera una pieza (2 o 3 piezas si son muy pequeñas) a una bolsa plástica.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 15 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

Coloque la bolsa en un recipiente grande. Añada caldo lactosado a una relación de 1:9 para cubrir las piezas. Mezcle bien y determine el pH con papel. Ajuste el pH si es necesario a  $6.8 \pm 0.2$ . Añada cualquiera de tergitol aniónico 7 o tritón X-100 calentados (15 minutos) arriba de 1% de concentración. Por ejemplo si se añaden 225 ml de caldo lactosado el volumen máximo para Añada surfactante es de 2.25 ml. Incube  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Continúe desde B.

#### **B. Aislamiento de *Salmonella spp*.**

Cierre bien la bolsa y agite suavemente la muestra incubada.

#### **Para goma guar y alimentos que puedan estar contaminados con *S. typhi*.**

- Transfiera 1 ml de muestra a 10 ml de caldo selenito cistina (SC) y 1 ml de muestra a 10 ml de caldo Tetrionato (TT). Homogenice en vortex.

#### **Todos los otros alimentos.**

- Transfiera 0,1 ml de muestra a 10 ml de Rappaport-Vassiliadis (RV) y 1 ml de muestra a 10 ml de caldo Tetrionato (TT). Homogenice en vortex.
- Incube los medios selectivos de enriquecimiento de la siguiente manera:

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 16 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

**Los alimentos con una alta carga microbiana.**

- Incube el RV durante  $24 \pm 2$  horas a  $42 \pm 0,2$  °C en baño de agua (con circulación y termostato regulable). Incube el caldo TT durante  $24 \pm 2$  horas a  $43 \pm 0,2$  °C En baño de agua (con circulación y termostato regulable).

**- Los alimentos con baja carga microbiana (con excepción de la goma de guar y alimentos que puedan estar contaminados con *S. typhi*).**

Incube el RV  $24 \pm 2$  horas a  $42 \pm 0,2$  °C en baño de agua (con circulación y termostato regulable). Incube el caldo TT  $24 \pm 2$  horas a  $35 \pm 2,0$ °C.

**La goma guar y alimentos que puedan estar contaminados con *S. typhi*.**

- Incube ambos caldos SC y TT por  $24 \pm 2$  horas a 35°C.

- Mezcle con ayuda del vortex el tubo (RPV, SC, TT) y estríe en los siguientes agares:

- Agar Bismuto Sulfito (BS), Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y Agar Hektoen Entérico (HE).

**NOTA:** Prepare las placas de BS un día antes de estriarlas y guárdelas en un lugar oscuro a temperatura ambiente hasta su uso.

- Incube las placas durante  $24 \pm 2$  horas a 35°C.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 17 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

- Examine las placas para detectar la presencia de colonias que pueden ser de ***Salmonella spp.***

Morfología colonial típica de ***Salmonella spp*** después de  $24 \pm 2$  h de incubación.

Las colonias típicas de ***Salmonella spp.*** Ver Figura N° 22.

**Agar HE.** Colonias de color azul-verde con o sin centro negro. Muchas colonias de ***Salmonella spp*** pueden producir colonias con los centros grandes, de color negro brillante o puede aparecer colonias casi completamente negras.

**Agar XLD.** Colonias color rosa con o sin centro negro. Muchas colonias de ***Salmonella spp*** pueden producir colonias con los centros grandes, de color negro brillante o puede aparecer colonias casi completamente negras.

**Agar BS.** Colonias de color Marrón, gris o negro, a veces tienen un brillo metálico. El medio es generalmente marrón al principio, pero puede tornarse más oscuro con un tiempo de incubación mayor al de las 24 horas, produciendo el efecto de halo.

Si las colonias típicas están presentes en el agar BS después de  $24 \pm 2$  h de incubación, elegir dos o más colonias. Independientemente de si las placas de agar BS son recogidos a las  $24 \pm 2$  h, re-incube las placas de agar BS otras  $24 \pm 2$  h.

Después de la incubación de  $48 \pm 2$  h, elija dos o más colonias típicas, si está presente, desde las placas de agar BS.

Si las colonias sacadas del agar BS se incuban durante  $24 \pm 2$  h dan reacciones atípicas en agar triple azúcar hierro (TSI) y agar hierro lisina (LIA) demuestra que la muestra no posee contaminación por *Salmonella*. Ver figura N° 23.

Realice pruebas bioquímicas en TSI, LIA, medio movilidad y la prueba de la ureasa, con una colonia típica de alguno de los tres agares (XLD, HE o BS). Ver Cuadro N° 3.

## 7. Formulario de calidad. Ver página N° 178.

### Marcha analítica.

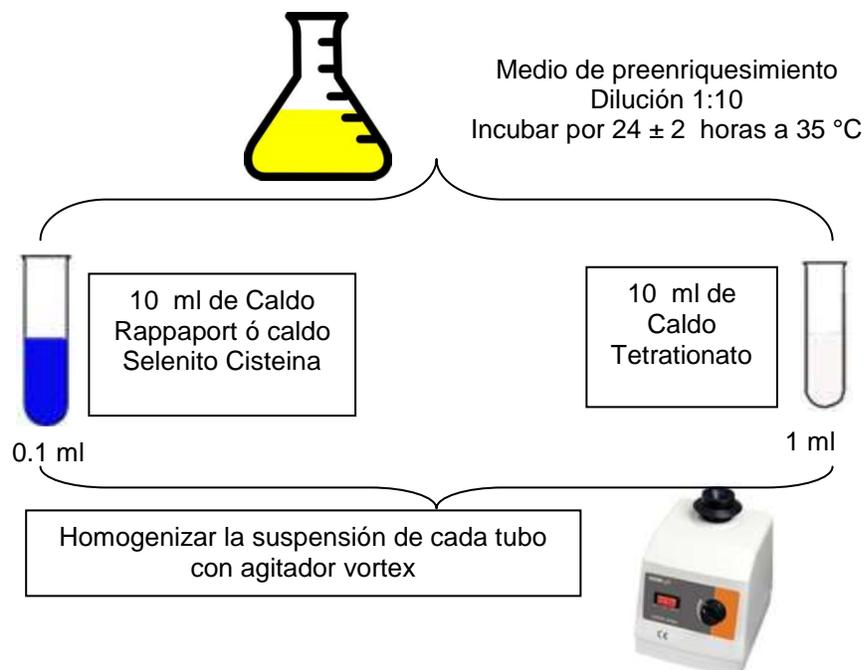
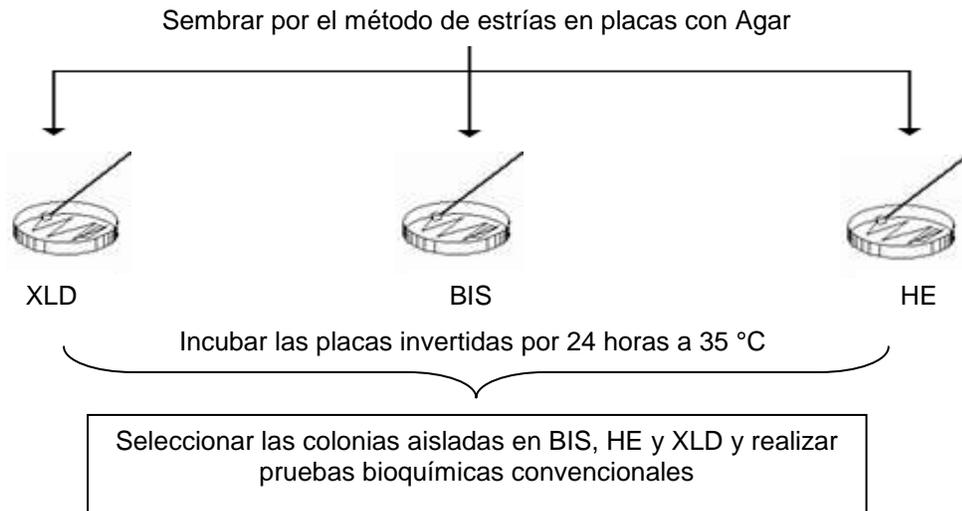


Figura N°21. Esquema para la Determinación de *Salmonella spp*



Continuación de Figura N°21

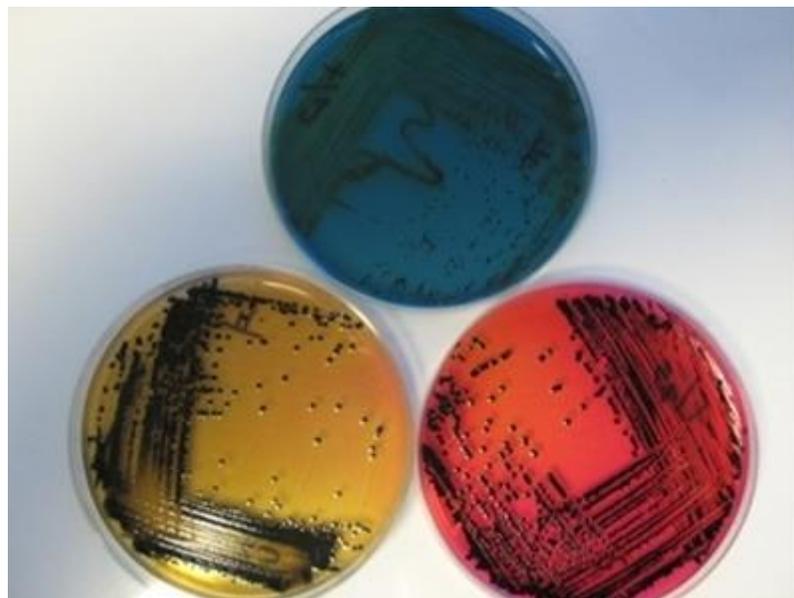


Figura N° 22. Colonias características de *Salmonella spp* en medios XLD, BS y HE

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 20 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

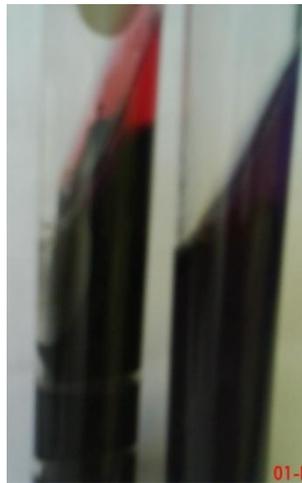


Figura N° 23. Reacción típica de *Salmonella spp* en TSI y LIA.

Cuadro N° 3. Reacciones bioquímicas típicas de *Salmonella spp*.

Medio de cultivo	Reacción típica
TSI	Bisel rojo(básico), fondo amarillo(ácido), producción de H <sub>2</sub> S, formación de gas ( B/A, H <sub>2</sub> S, g)
LIA	Bisel purpura(básico), fondo purpura(básico), producción de H <sub>2</sub> S, sin formación de gas (B/B, H <sub>2</sub> S)
Movilidad	Movilidad positiva
Ureasa	No presenta ningún vire de color (amarillo)

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 21 de 23
	Determinación de <i>Salmonella spp</i>	Version:0

**Prueba Serológica polivalente flagelar (H).** Ver Figura N° 24 y 25.

Inocule del crecimiento característico de TSI inclinado y ureasa negativa, en caldo BHI e incube 4-6 horas a 35 ° C hasta que obtenga crecimiento visible (para poner a prueba el mismo día). Añada 2,5 ml de solución salina fisiológica formalinizada a 5 ml de caldo de cultivo tampoco.

Seleccione dos caldos de cultivo formalinizados y prueba con ***Salmonella*** polivalente flagelar (H) antisueros.

Coloque 0.5 ml de antisuero adecuadamente diluida en tubo de prueba serológica. Añada 0,5 ml de antígeno a ensayar.

Prepare el control de solución salina mezclando 0,5 ml de solución salina fisiológica formalinizados con 0,5 ml de antígeno formalinizados.

Incube en baño maría de 48-50 °C. Observe a intervalos de 15 minutos y lea los resultados finales en 1 h.

**Interpretación de los resultados:**

Positivo: Aglutinación en la mezcla de prueba y sin aglutinación en el control.

Negativo: No hay aglutinación en la mezcla de prueba y en el control.

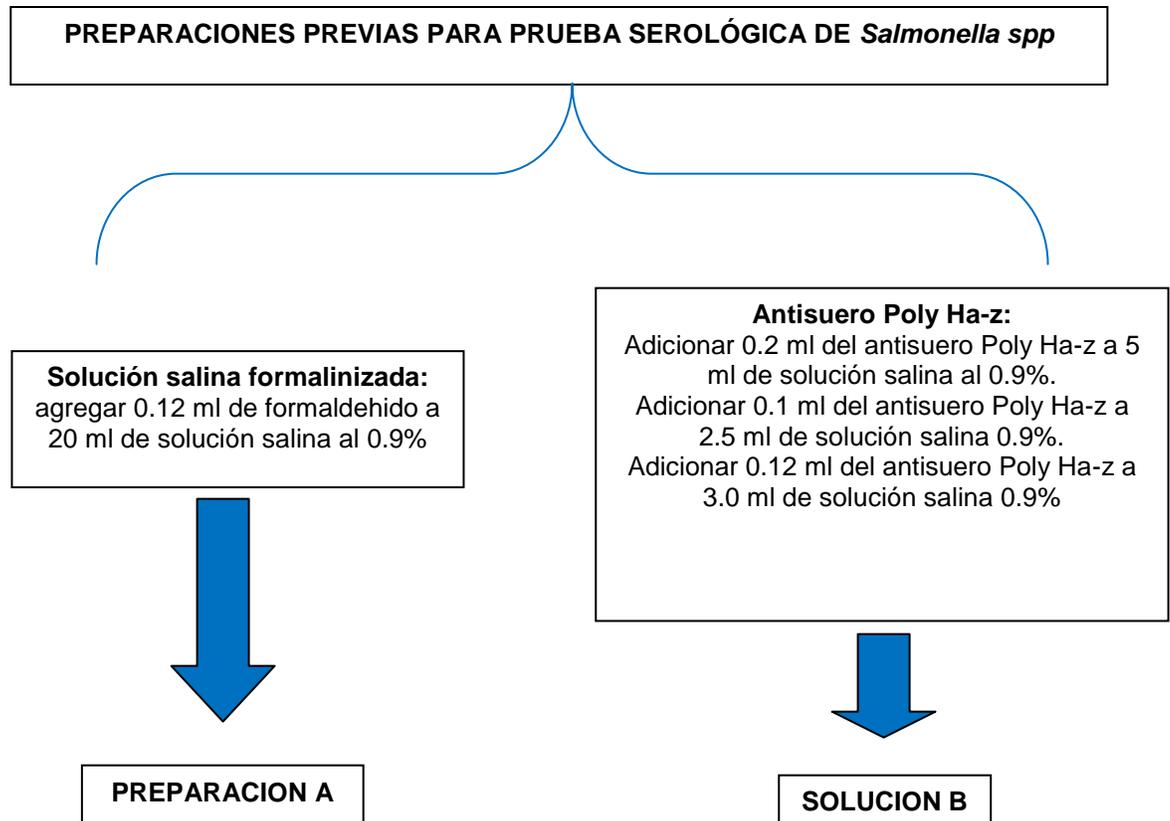


Figura N° 24. Preparaciones previas para la prueba serológica de *Salmonella spp* <sup>(4)</sup>

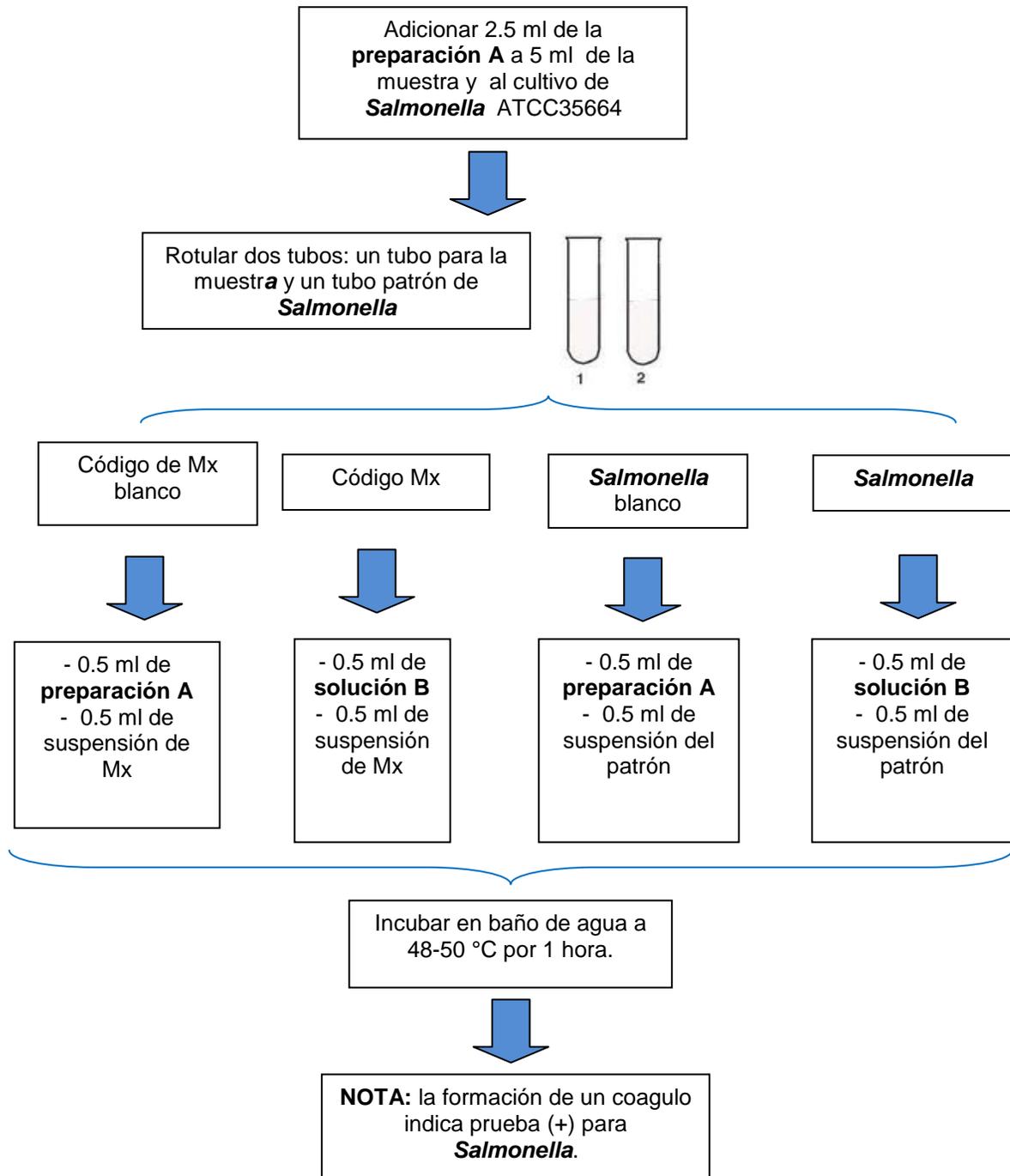


Figura N° 25. Prueba serológica para *Salmonella spp* <sup>(4)</sup>

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 1 de 8
	Enumeración de <i>Staphylococcus aureus</i>	Versión: 0

## 1. Objetivo

Describir el método para la enumeración de ***S. aureus*** presente en leche y productos lácteos; grasa, aceites y emulsiones grasas; productos de confitería; cereales y derivados; pan, productos de panadería y pastelería; carnes y productos cárnicos; pescado, derivados y productos marinos; salsas, aderezos, especias y condimentos; alimentos para usos nutricionales especiales; bocadillos; caldos, sopas, cremas y mezclas deshidratadas; alimentos listos para consumir.

## 2. Alcance

Esta metodología aplica a todo tipo de alimento al que se le desee determinar la presencia de ***Staphylococcus aureus***.

## 3. Descripción y resumen del método <sup>(5)</sup>

El ***Staphylococcus aureus*** es altamente vulnerable a la destrucción por el tratamiento térmico y casi todos los agentes desinfectantes. Así que la presencia de esta bacteria o sus enterotoxinas en los alimentos procesados o en equipos de procesamiento de alimentos es en general una indicación de la falta de saneamiento.

### Método de conteo directo en placa.

Este método es adecuado para el análisis de alimentos en los que más de 100 ***Staphylococcus aureus*** células / g se puede esperar.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 2 de 8
	Enumeración de <i>Staphylococcus aureus</i>	Versión: 0

El método consiste en una inoculación directa sobre la superficie de la placa con agar Baird Parker, el cual se homogeniza con ayuda de una varilla de vidrio.

#### 4. Materiales y equipo

1. Bolsas estériles whirl pak.
2. Cuchillos, tenedores, espátulas, pinzas, tijeras, cucharas estériles
3. Pipetas estériles graduadas de 1.0 y 10.0 ml.
4. Varillas de vidrio dobladas estériles
5. Asa de inoculación, en punta y en aro.
6. Stomacher.
7. Balanza con capacidad de 2000 g de peso y sensibilidad de 0,1 g
8. Incubadora a 35°C.

#### 5. Reactivos y medios de cultivo

1. Solución de Huevo mas telurito.
2. Peróxido de hidrogeno para la Prueba de la catalasa
3. Agar Baird-Parker. Dispensado en placas Petri estériles (vidrio o plástico) y solidificado.
4. Agar Tripticasa (tríptico) de soya (TSA).
5. Caldo Brain heart infusion (BHI) o Infusión cerebro corazón (ICC)
6. Coagulasa plasma de conejo con EDTA.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 3 de 8
	Enumeración de <i>Staphylococcus aureus</i>	Versión: 0

## 6. Procedimiento. <sup>(5)</sup>

### A. Preparación de la muestra

- Pese asépticamente 25 o 50 g de la muestra.
- Agregue asépticamente 225mL o 450 ml de agua peptonada al 0,1% (dilución  $10^{-1}$ ).
- Homogenice en stomacher durante 2 min.
- Haga las diluciones según sea necesario: 1:10, 1:100 ,1:1000, etc.

**NOTA:** Hacer diluciones según el tipo de alimento y la carga de contaminación esperada.

### B. Aislamiento y enumeración de *Staphylococcus aureus*

- Para cada dilución preparada y según sea necesario, transfiera asépticamente 1 ml de suspensión de la muestra a 3 placas de agar Baird-Parker, distribuya 1 ml de inóculo de manera equitativa en cada una de 3 placas (por ejemplo, 0,4 ml, 0,3 ml y 0,3 ml).
- Difunda el inóculo sobre la superficie de la placa de agar, utilizando varilla de vidrio doblada estéril.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 4 de 8
	Enumeración de <i>Staphylococcus aureus</i>	Versión: 0

- Conserve las placas en posición vertical hasta que el inóculo sea absorbido por el agar (alrededor de 10 minutos para que las placas estén adecuadamente secas).

**NOTA:** Si el inóculo no es fácilmente absorbido, coloque las placas en posición vertical en la incubadora durante 1 h.

- Invierta las placas e incube por 45-48 horas a 35°C.

- Seleccione para el conteo las placas que contienen de 20 a 200 colonias con aspecto típico de ***S. aureus***. Las colonias de ***S. aureus*** en agar Baird-Parker son redondas, de bordes lisos, convexas, de 2-3 mm de diámetro, húmedas, brillantes, negras, con un borde blanco fino, rodeadas de una zona opaca y de un halo claro de 2-5 mm; las colonias poseen una consistencia pegajosa al tacto con la aguja de inoculación. Ver Figura N° 27.

Las cepas aisladas de alimentos congelados o disecados que se han almacenado durante períodos prolongados con frecuencia desarrollan coloración menos negra de colonias típicas y pueden tener aspecto rugoso y textura seca.

Si se observan varios tipos de colonias que parecen ser ***S. aureus*** en las placas seleccionadas, cuente el número de colonias de cada tipo y registre por separado. Utilice las placas de la dilución que contiene menos de 20 colonias

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 5 de 8
	Enumeración de <i><b>Staphylococcus aureus</b></i>	Versión: 0

- Seleccione una colonia de cada placa contada para la producción de coagulasa. Sume las colonias características y multiplique por el factor de dilución de la muestra.
- Informe este número como el número de ***Staphylococcus aureus*** / g de alimento analizado. Ej.: 120 UFC/g

**Prueba de coagulasa.** Ver figura N° 28.

- Transfiera las colonias sospechosas de ***S. aureus*** en pequeños tubos que contienen 0,2-0,3 ml de caldo BHI o ICC y emulsione bien.
- Siembre de la emulsión hecha con un asa de inoculación, a un tubo que contenga TSA inclinado como medio de mantenimiento
- Incube el BHI o ICC y el TSA de 18 a 24 horas a 35° C.
- Añada 0,5 ml de plasma y mezcle bien.
- Incube a 35°C y examine periódicamente durante un periodo 6 h para la formación del coágulo.
- Sólo el coagulo que se queda fijo cuando el tubo está inclinado o invertido se considera positivo para ***Staphylococcus aureus*** y se identifica con una cruz (+), entre más firme es el coagulo mas cruces se colocan, máximo 4+. Ver Figura N° 28.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 6 de 8
	Enumeración de <i>Staphylococcus aureus</i>	Versión: 0

**Exámenes complementarios. NOTA:** Utilice el crecimiento de TSA inclinado de la prueba de Coagulasa

**Prueba de la catalasa.** Ver Figura N° 29.

- Coloque un poco de crecimiento en un portaobjetos de vidrio o dentro de una placa Petri y coloque con ayuda de una pipeta, una gota de peróxido de hidrogeno y observe.

**Tinción al Gram.** Ver Figura N° 30.

- El *Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo, en forma de racimos, aunque también se le puede evidenciar en cadenas cortas o diplococos, es inmóvil y no forma esporas.

**7. Formulario de calidad.** Ver página: 179.

**Marcha.**

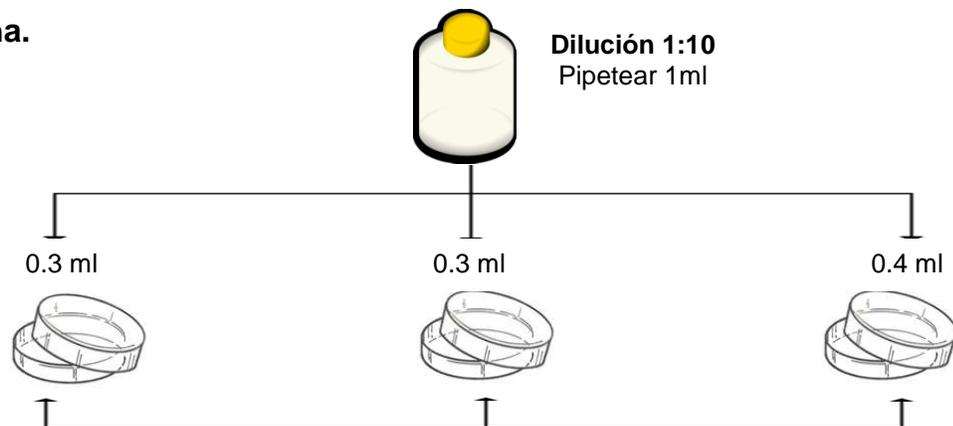
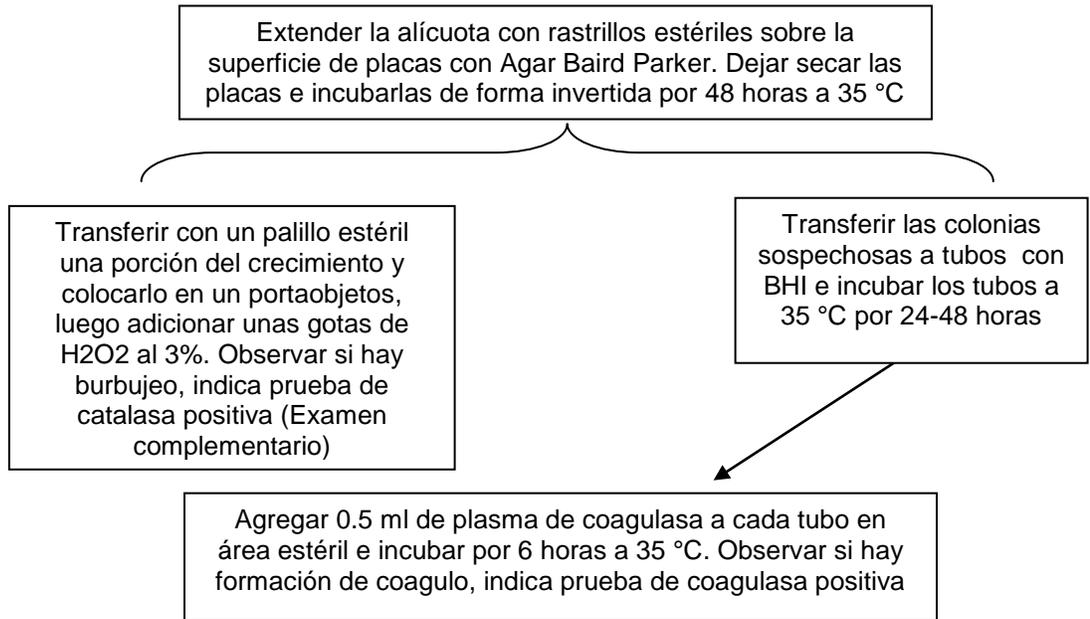


Figura N°26. Esquema para la Enumeración de *Staphylococcus aureus*



Continuación de Figura N°26

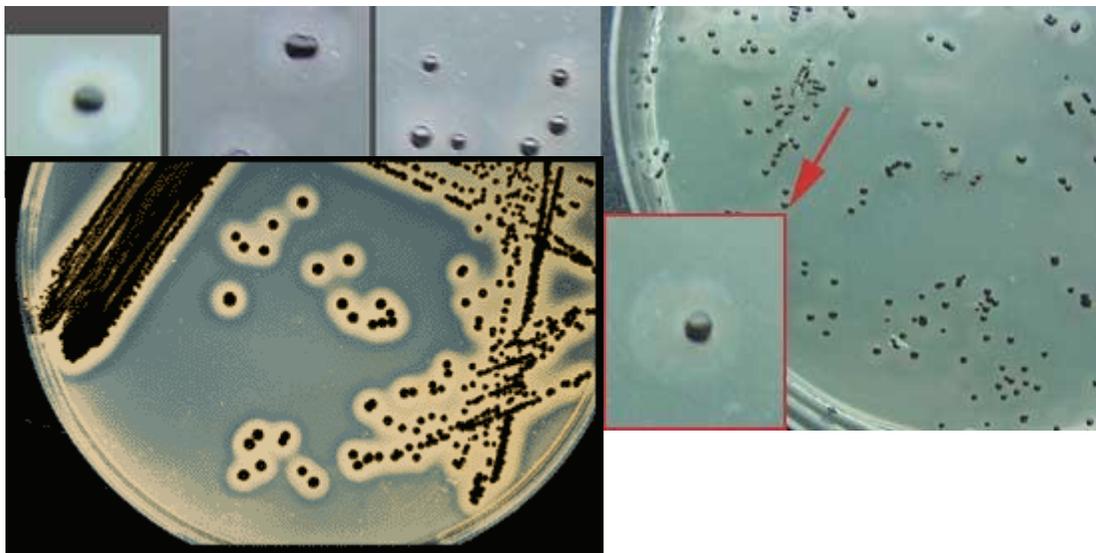


Figura N° 27. Colonias características de *Staphylococcus aureus* en Agar Baird-Parker

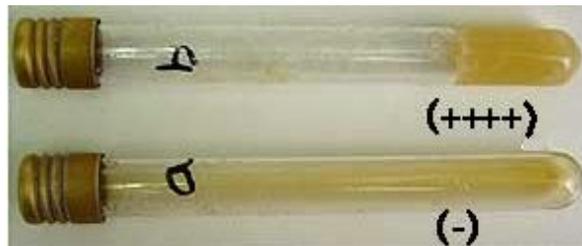


Figura N° 28. Control positivo y control negativo de prueba de coagulasa

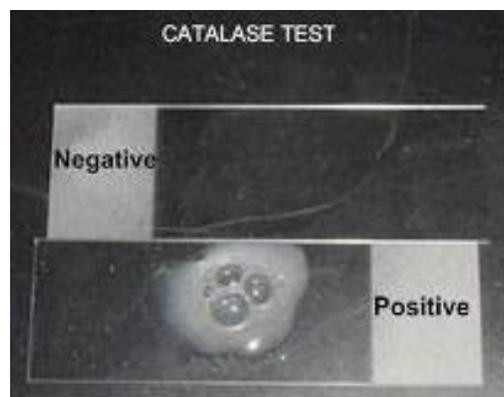


Figura N° 29. Control positivo y negativo de prueba de la catalasa

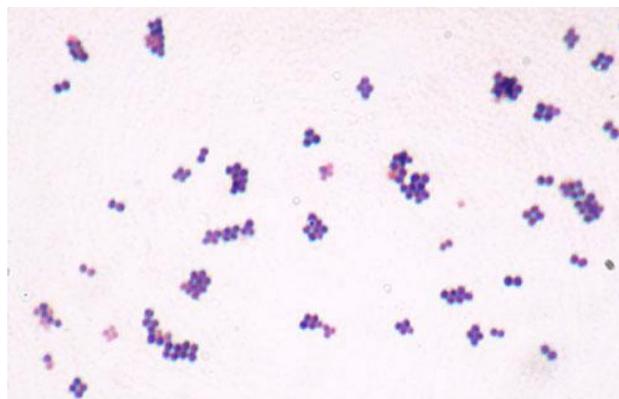


Figura N° 30. Morfología microscópica de *Staphylococcus aureus* (Tinción de Gram)

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 1 de 6
	Conteo total de bacterias aeróbicas en alimentos y bebidas	Versión: 0

## 1. Objetivo

Describir el método para el conteo total de bacterias aeróbicas mesófilas en leche UHT y crema UHT en empaque aséptico; leche condensada, evaporada y dulce de leche; hortalizas y frutas enlatadas; pescado, moluscos, equinodermos y crustáceos enlatados; alimentos complementarios para niños de pecho (0 a 6 meses) y niños pequeños (12 a 36 meses).

## 2. Alcance

Este procedimiento aplica a bebidas y alimentos a los que se les desee determinar la cantidad de bacterias aeróbicas mesófilas que poseen.

## 3. Descripción y resumen del método <sup>(5)</sup>

Las bacterias aeróbicas son aquellas que requieren oxígeno para su crecimiento.

El conteo total de bacterias es un procedimiento para estimar el nivel de microorganismos en un producto. Las colonias pueden formarse de células individuales, de bacterias en pares, cadenas o agrupaciones, razón por lo cual están incluidas en el término Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

El conteo final depende de: la interacción entre las colonias en desarrollo, el procedimiento aplicado y el medio de cultivo que produce el mayor número de colonias dentro del período de incubación designado.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 2 de 6
	Conteo total de bacterias aeróbicas en alimentos y bebidas	Versión: 0

El intervalo adecuado para el contaje es de 25-250 colonias.

#### 4. Materiales y equipo

1. Pipetas graduadas de 10, 5 y 1 ml
2. Placas de petri estériles
3. Pipeteador
4. Balanza
5. Incubadora a  $35 \pm 1$  °C
6. Contador de colonias

#### 5. Medios de cultivo

1. Plate Count Agar (PCA)
2. Agua buferada de fosfatos de Butterfield de 225 ml, 90 ml.

#### 6. Procedimiento. <sup>(5)</sup>

- Pese 25 g o mida 25 ml de muestra y homogenice en 225 ml de agua buferada de fosfatos de butterfield.
- Prepare las diluciones que sean necesarias transfiriendo 10 ml de la dilución previa a 90 ml de diluyente.
- Agite las diluciones al menos 25 veces.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 3 de 6
	Conteo total de bacterias aeróbicas en alimentos y bebidas	Versión: 0

- Dispense con ayuda de una pipeta, 1 ml de cada dilución dentro de 2 placas petri.
- Adicione 15 a 20 ml del medio PCA a una temperatura aproximada de 45°C.
- Mezcle completamente rotando las placas sobre una superficie formando la figura del número ocho.
- Deje solidificar e inviértalas cuando el medio ha solidificado.
- Incube a 35°C por 48 ± 2 horas.
- Cuento las placas que contienen de 25 a 250 colonias con ayuda de un cuenta colonias.

### **Cálculos**

- Calcule el conteo total de bacterias multiplicando el promedio del número de colonias contadas por el factor de dilución.
- Si las diluciones no presentan crecimiento, informe el conteo como menor que 1 a la dilución correspondiente menor utilizada.
- Si el número de colonias por placa excede las 250 y hay menos de 10 colonias por centímetro cuadrado, cuente las colonias de 13 cuadros tomando en cuenta una distribución representativa. Si es posible, seleccione 7 cuadros

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 4 de 6
	Conteo total de bacterias aeróbicas en alimentos y bebidas	Versión: 0

horizontales consecutivos y 6 verticales cuidando de contar cada cuadro una sola vez. Multiplique la suma del número de colonias de los 13 centímetros cuadrados entre el área de de la placa petri utilizada.

Tome en cuenta la dilución contada.

- Cuando hay más de 10 colonias por centímetro cuadrado, cuente 4 cuadros representativos, obtenga el promedio por centímetro cuadrado y multiplique por el factor apropiado para estimar el número de colonias por placa.
- Cuando el conteo de bacterias es mayor de 100 colonias por centímetro cuadrado informe como mayor de según el área de la placa.
- Si en las placas se encuentran colonias que son expansivas, cuente las colonias de un área representativa únicamente cuando las colonias estén bien distribuidas en áreas libres de colonias expansivas y que el área cubierta por la (s) expansivas no exceda la mitad del área de la placa.
- Cuando se pueden contar las colonias expansivas cuente los siguientes tipos como: una cadena de colonias que parece ser causada por desintegración de un cumulo bacterial cuando el agar y la muestra se mezclaron; una expansiva que se desarrollo como una película de crecimiento entre el agar y el fondo de la caja petri; y una colonia que se forma en una película de agua en el borde o sobre la superficie del agar.

- Cuente como colonias individuales las colonias que tienen apariencia de colonias creciendo muy próximas pero que no se tocan, quedando una distancia entre ellas igual al diámetro de la colonia más pequeña. Cuente las colonias puntiformes que difieren en apariencia, morfología y color, como colonias individuales.
- Exprese el resultado como UFC/ g o ml utilizando 2 cifras significativas.  
 Ejemplo 1: si el conteo es de 255 UFC, exprese el resultado como 260 UFC/ ml. Ejemplo 2: si el conteo es de 132, exprese el resultado como 130 UFC/ ml.

**7. Formulario de calidad.** Ver página: 180.

**Marcha.**

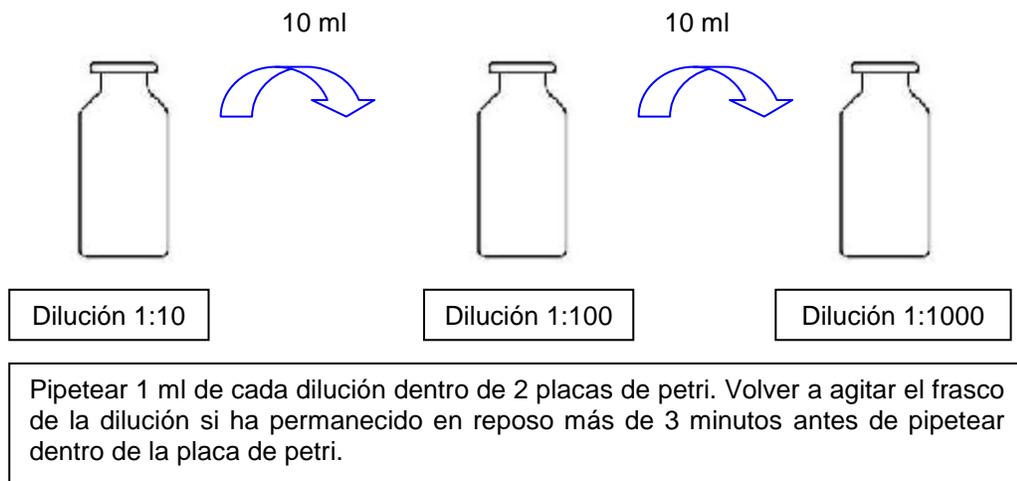
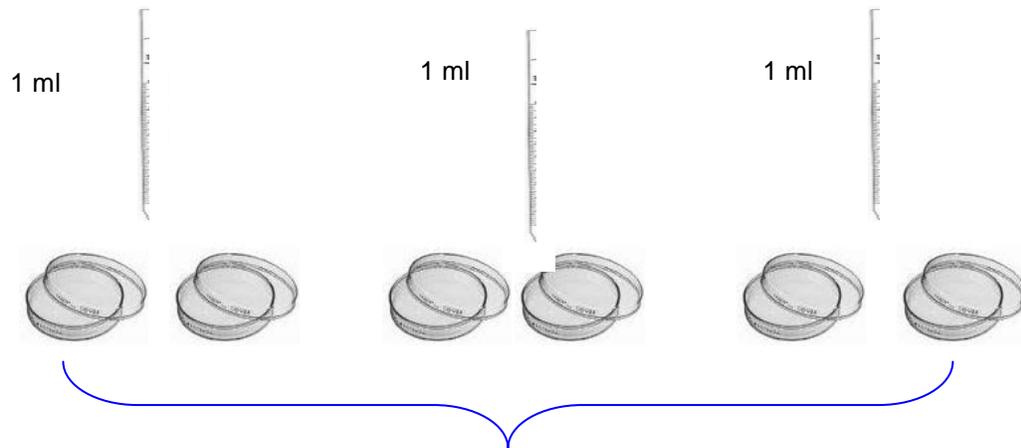
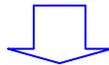


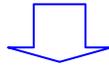
Figura N° 31. Esquema para la cuantificación de bacterias aeróbicas



Adicionar 15 ml del medio agar para conteo en placa enfriado a 45°C dentro de los 15 minutos de preparadas las diluciones, mezclar completamente rotando las placas sobre una superficie formando la figura del número ocho. Dejar solidificar las placas e invertirlas cuando el medio ha solidificado.



Incubar a 35°C por 48 ± 2 horas. Las placas pueden estar en columnas de cinco durante la



Contar las placas conteniendo 25 a 250 colonias usando el cuentacolonias.

Continuación de Figura N° 31

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 1 de 11
	Enumeración de <i>Bacillus cereus</i>	Versión: 0

## 1. Objetivo

Describir la técnica de el conteo de *Bacillus cereus* en alimentos complementarios para niños de pecho (0 a 6 meses) y niños pequeños (12 a 36 meses); mezclas en seco instantáneas para postres (flanes, pudines y gelatinas).

## 2. Alcance

Este procedimiento aplica a las muestras de alimentos a las cuales se les desee enumerar la cantidad de células viables de *Bacillus cereus*

## 3. Descripción y resumen del método <sup>(5)</sup>

La intoxicación alimentaria causada por *Bacillus cereus* puede ocurrir cuando los alimentos son preparados y mantenidos sin la refrigeración adecuada durante varias horas antes de servir. *Bacillus cereus* es una bacteria aeróbica formadores de esporas que se encuentra comúnmente en el suelo, en las hortalizas y en muchos alimentos crudos y procesados.

El consumo de alimentos que contienen  $> 10^6$  *Bacillus Cereus* /g puede provocar intoxicación alimentaria.

Dos tipos de enfermedades se han atribuido al consumo de alimentos contaminados con *Bacillus cereus*, la primera y más conocida se caracteriza por dolor abdominal y diarrea, tiene un período de incubación de 4-16 h y los

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 2 de 11
	Enumeración de <i>Bacillus cereus</i>	Versión: 0

síntomas que duran de 12 a 24 h. La segunda, que se caracteriza por un ataque agudo de náuseas y vómitos, se produce en 1-5 h después del consumo de alimentos contaminados, la diarrea no es una característica común en este tipo de enfermedad.

El método consiste en inocular una dilución 1:100 sobre placas que contienen agar MYP y extender el inóculo con ayuda de una varilla de vidrio.

#### 4. Materiales y equipo

1. Pipetas graduadas estériles de 10 y 1 ml.
2. Placas de petri estériles.
3. Bolsas estériles.
4. Cuchillos, tenedores, espátulas, pinzas, tijeras, cucharas estériles.
5. Varillas de vidrio dobladas de 3-4 mm de diámetro con 45 a 55 mm de área de difusión.
6. Marcador.
7. Asas de alambre de platino.
8. Pipeteador.
9. Mecheros Bunsen.
10. Balanza con capacidad de 2000 g de peso y sensibilidad de 0,1 g.
11. Incubadoras a  $30 \pm 2$  °C y  $35 \pm 2$  °C.
12. Baño de agua a 48-50 °C.
13. Cuenta colonias.
14. Vortex.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 3 de 11
	Enumeración de <i>Bacillus cereus</i>	Versión: 0

15. Microscopio.

16. Stomacher

## 5. Reactivos y medios de cultivo

1. Emulsión de yema de huevo al 50%
2. Alfa naftol
3. Hidróxido de potasio
4. Placas de Agar Manitol-yema de huevo- polimixina (MYP)
5. Medio Voges-Proskauer
6. Caldo de nitrato
7. Agar nutriente para *Bacillus cereus*
8. Medio movilidad
9. Agua Buferada de fosfatos de Butterfield (solución para diluciones)

## 6. Procedimiento <sup>(5)</sup>

### Preparación de la muestra

- Pese 25 g, agregue 225 ml de buffer de fosfatos (dilución 1:10) y homogenice 1-2 minutos a velocidad alta.

### Recuento en placa de *Bacillus cereus*.

- Prepare las diluciones que sean necesarias transfiriendo 10 ml de la dilución

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 4 de 11
	Enumeración de <i>Bacillus cereus</i>	Versión: 0

previa a 90 ml de diluyente. Mezcle bien con agitación vigorosa todas las diluciones.

- Inocule por duplicado en placas de petri conteniendo MYP con 0.1 ml de cada dilución y distribuya sobre la superficie del medio.
- Incube a 30°C durante 24-30 horas.
- Las Colonias de *Bacillus cereus* son usualmente de color rosado que se intensifica después de incubación adicional, las colonias están rodeadas por una zona de precipitado que indica la producción de lecitinaza.
- Si la reacción no es clara, incube las cajas durante 24 horas adicionales antes de contar las colonias.

#### **Confirmación de *Bacillus cereus*.**

- Si el numero de colonias con características de *Bacillus cereus* es alto, seleccione 5 o más colonias y transfíralas a tubos con agar nutritivo e incube 24 horas a 30°C. Anote el número de colonias contadas.
- A partir del cultivo en agar nutritivo, prepare un frotis y colorea por tinción de Gram y examine microscópicamente. El *Bacillus cereus* es un bacilo largo Gram positivo que forma cadenas cortas y largas; las esporas son elipsoidales, centrales o subterminales y no hinchan el esporangio.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 5 de 11
	Enumeración de <i>Bacillus cereus</i>	Versión: 0

- Siembre en agar nutritivo, en placa o tubo inclinado e incube a 50°C durante 18-24 horas. Los miembros del grupo *Bacillus cereus* no crecen a esta temperatura.

### **Pruebas para diferenciar los miembros del grupo *Bacillus cereus*.**

Las siguientes pruebas son útiles para diferenciar cepas típicas de *Bacillus cereus* de otros miembros del grupo *Bacillus cereus* que incluyen *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus anthracis*.

- **Prueba de movilidad:** agregue 0.2 ml de agua destilada estéril sobre la superficie de agar nutritivo en tubo, inocule con una asada de suspensión del cultivo bajo estudio. Incube los tubos 6-8 horas a 30°C. Suspenda una del cultivo tomado de la base del bisel en una gota de agua desmineralizada estéril colocada en un portaobjetos, coloque una laminilla (cubreobjetos) e inmediatamente examine al microscopio para observar movilidad.

La mayoría de cepas de *Bacillus cereus* son móviles por tener flagelos periticos.

- **Crecimiento rizoide:** prepare placas con 18-20 ml de agar nutritivo y déjelas secar 1-2 días a temperatura ambiente. Inocule el centro de la placa con una asada de suspensión del cultivo sospechoso. Deje que el inoculo se absorba e incube 48-72 horas a 30°C. Examine las placas para crecimiento rizoide, que se caracteriza por la producción de colonias con estructuras parecidas a cabello largo raíces, que se extienden varios centímetros desde el sitio de

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 6 de 11
	Enumeración de <i>Bacillus cereus</i>	Versión: 0

inoculación. *Bacillus cereus* frecuentemente produce colonias tipo galaxia que no deben confundirse con el crecimiento rizoide, el cual es característico de *Bacillus mycoides*.

- **Prueba para cristales de proteína toxica:** de un cultivo de 2-3 días en agar nutritivo en tubo, prepare un frotis en agua destilada. Seque al aire y fije pasando la lámina sobre la llama del mechero. Coloque la lámina sobre una bandeja de coloración e inunde con metanol la preparación durante 30 segundos.

Escorra el metanol y deje secar al aire. De nuevo coloque la lamina sobre la bandeja, cubra la preparación con fucsina básica al 0.5% o colorante TB carbolfucsina ZN. Caliente la lamina con ayuda de un quemador hasta que se observe vapor.

Espere 1-2 minutos y repita el calentamiento. Deje reposar 30 segundos, escurra el colorante y lave con un poco de agua. Seque la lámina y examine en el microscopio y observe la presencia de esporas libres y cristales tetragonales (forma de diamante) de toxina fuertemente coloreados. Los cristales son un poco más pequeños que las esporas.

Los cristales son usualmente abundantes en cultivos de *Bacillus thuringiensis* de 3-4 días de incubación, pero no pueden ser detectados por técnicas de coloración hasta que ocurra lisis del esporangio. Por lo tanto, si no se han visto esporas libres, los cultivos deben mantenerse a temperatura ambiente durante unos días más y luego re-examine para cristales tóxicos.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 7 de 11
	Enumeración de <i>Bacillus cereus</i>	Versión: 0

*Bacillus thuringiensis* produce cristales de proteína toxica que pueden ser detectados por coloración como cristales libres o cuerpos de inclusión parasporal sin el exosporio. *Bacillus cereus* y otros miembros del grupo *Bacillus cereus* no producen cristales de proteína toxica. Ver Cuadro N° 4.

### Cálculos

Calcule el número de *Bacillus cereus* en la muestra sobre la base del porcentaje de colonias probadas y confirmadas.

Ejemplo: si el promedio del contaje de la dilución  $10^{-4}$  fue 65 y 4 de 5 colonias fueron confirmadas, el número de células/ g de alimentos es  $65 \times (4/5) \times 10,000 \times 10 = 5,200,000$ .

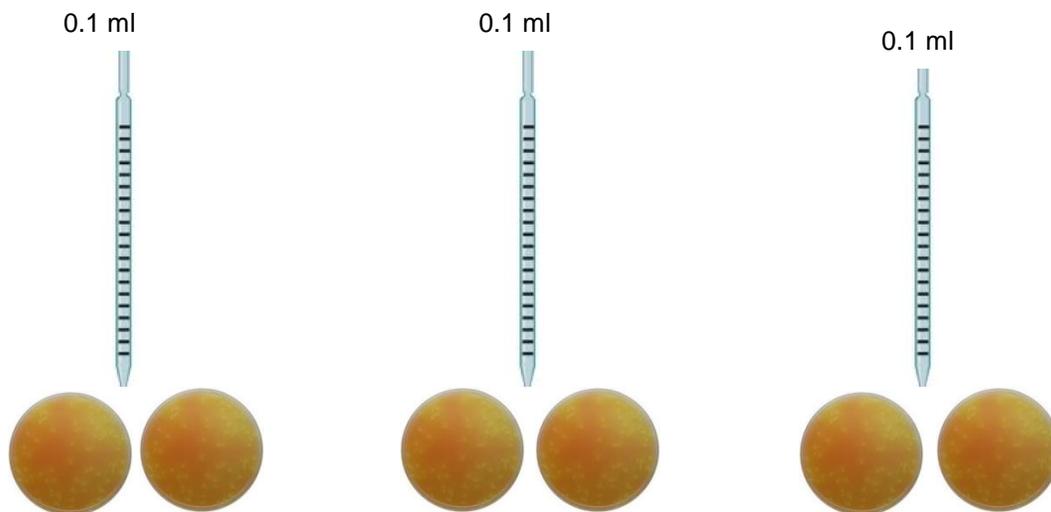
Expresar el resultado como UFC/ g o ml utilizando 2 cifras significativas.

7. Formulario de calidad, Ver página: 181.

### Marcha.



Figura N° 32. Esquema para la Enumeración de *Bacillus cereus*



Inocular por duplicado en placas de petri conteniendo MYP con 0.1 ml de cada dilución y esparcir sobre la superficie del medio.



Incubar a 30°C durante 24-30 horas. Las Colonias de *B. cereus* son usualmente de color rosado que se intensifica después de incubación adicional, las colonias están rodeadas por una zona de precipitado que indica la producción de lecitinaza. Si la reacción no es clara, incubar las placas durante 24 horas adicionales antes de contar las colonias. Anotar el número de colonias y transferir a tubos con AN



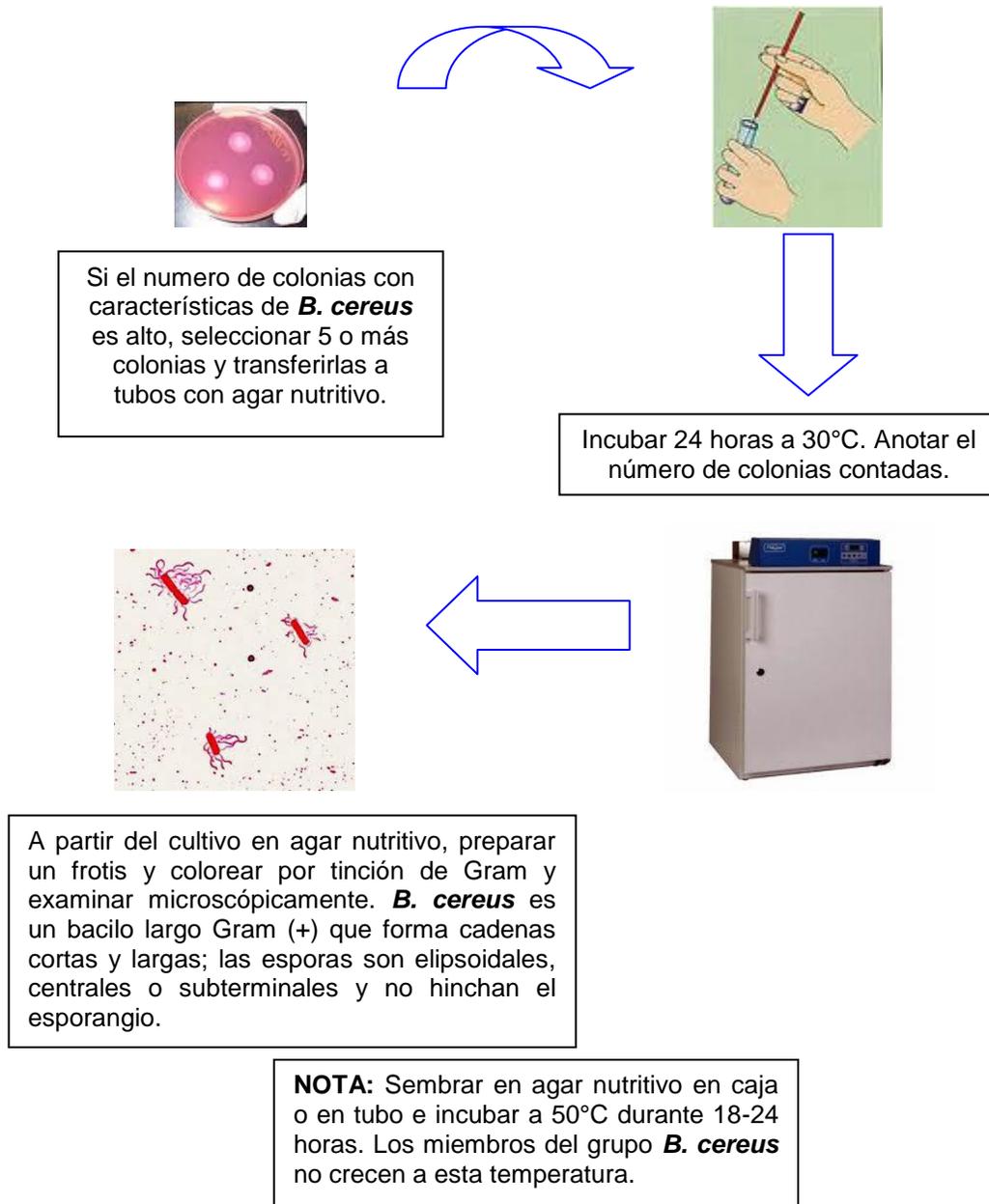
Incubar a 50°/24h Grupo *B. cereus* no crece



Incubar a 30°C por 24 h (Grupo *B. cereus* es Gram (+), esporas elipsoidales, centrales o subterminales, no hinchan el esporangio

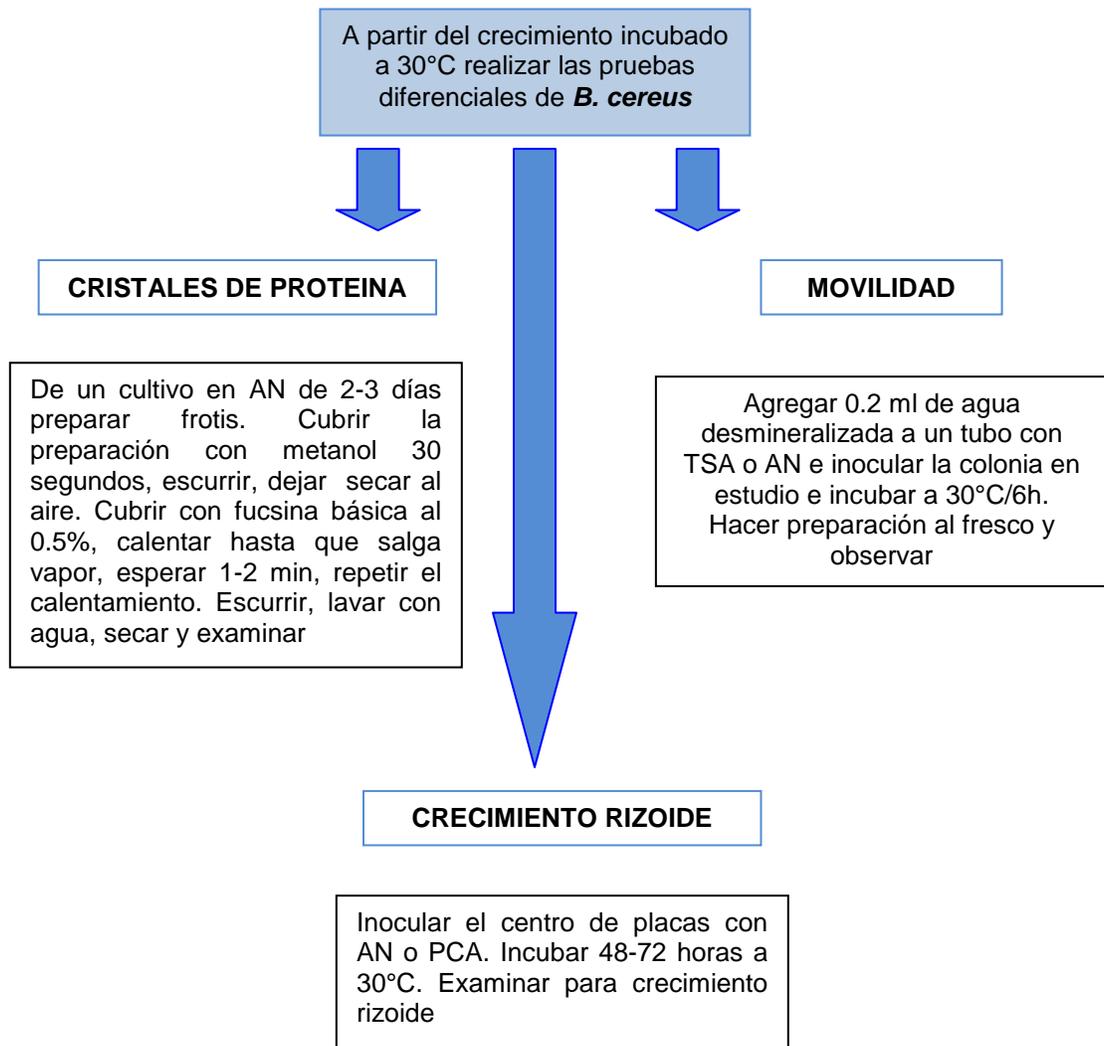
Continuación de Figura N° 32

### Confirmación de *Bacillus cereus*



Continuación de Figura N° 32

### Pruebas diferenciales para *Bacillus cereus*



Continuación de Figura N° 32

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 11 de 11
	Enumeración de <i>Bacillus cereus</i>	Versión: 0

Cuadro N°4. Características Diferenciales de las Especies del Grupo ***Bacillus cereus***

Prueba	<i>B. Cereus</i>	<i>B.thuringiensis</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. anthracis</i>
Colonias rosadas con halo de lecitinasa en agar MYP	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+
Espora elipsoidal, central o subterminal y no hincha el esporangio	+	+	+	+
Tinción de Gram, cadenas cortas a largas	+	+	+	+
Movilidad	+	+	-	-
Crecimiento rizoide	-	-	+	-
Cristales tóxicos	-	+	-	-
Crecimiento a 50°C	-	-	-	-

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 1 de 8
	Enumeración de <i>Clostridium perfringens</i>	Versión: 0

## 1. Objetivo

Describir el método para la enumeración de *Clostridium perfringens* en carnes curadas (chorizos); carnes congeladas, incluyendo empanizados y rebozados; alimentos listos para consumir.

## 2. Alcance

Aplica a toda muestra de alimentos la que se le desee enumerar la cantidad de células viables presentes de *Clostridium perfringens*.

## 3. Descripción y resumen del método <sup>(5)</sup>

La intoxicación causada por *Clostridium perfringens* puede ocurrir cuando alimentos como carnes y pollo han sido cocinados y se han mantenido sin el adecuado calentamiento o refrigeración antes de servirlos. La presencia de un número pequeño de *Clostridium perfringens* no es raro en carnes y pollos crudos, sopas y salsas deshidratadas, vegetales crudos y especias. Debido a que las esporas de algunas cepas son resistentes a temperaturas tan altas como 100°C por más de una hora, su presencia en alimentos es inevitable.

Por otra parte el nivel de oxígeno puede ser suficientemente reducido durante el cocinado para permitir el crecimiento de *Clostridium*. Las esporas que sobreviven al cocinado pueden germinar y crecer rápidamente en alimentos que son inadecuadamente refrigerados después de cocinados.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 2 de 8
	Enumeración de <i>Clostridium perfringens</i>	Versión: 0

Típicamente la enfermedad ocurre 8-15 horas después de la ingestión del alimento contaminado. Los síntomas, los cuales incluyen espasmo abdominal, gas y diarrea (nausea y vomito son raros), se atribuyen a una enterotoxina producida durante la esporulación de la bacteria en el intestino.

Las células de *Clostridium perfringens* pierden su viabilidad cuando los alimentos se congelan o se mantienen bajo condiciones de refrigeración prolongada.

La metodología convencional es prepara una o varias diluciones decimales e inocularlas en placas petri con una capa basal de agar SFP y luego recubrir con otra capa para su incubación en ambiente anaeróbico.

#### 4. Materiales y equipo

1. Pipetas graduadas estériles de 10 y 1 ml
2. Placas de petri de vidrio o desechables estériles
3. Pipeteador
4. Bolsas estériles.
5. Cuchillos, tenedores, espátulas, pinzas, tijeras, cucharas estériles.
6. Marcador.
7. Asas de alambre de platino.
8. Mecheros Bunsen.
9. Balanza con capacidad de 2000 g de peso y sensibilidad de 0,1 g.
10. Stomacher.
11. Balanza

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 3 de 8
	Enumeración de <i>Clostridium perfringens</i>	Versión: 0

12. Incubadora de 35°C
13. Cuenta colonias
14. Baño de agua a 46°C
15. Jarra de anaerobiosis

### 5. Medios de cultivo

1. Agar SFP
2. Caldo de hígado picado
3. Medio de tioglicolato
4. Medio con leche y hierro
5. Medio lactosa-gelatina
6. Medio movilidad-nitrato
7. Agua peptonada al 0.1%

### 6. Procedimiento. <sup>(5)</sup>

- Pese 25 g o mida 25 ml de muestra, agregue 225 ml de peptona 0.1% y homogenice 1-2 minutos. Obtenga un homogenizado uniforme con la mínima aireación posible.
- Prepare las diluciones que sean necesarias transfiriendo 10 ml de la dilución previa a 90 ml de diluyente. Agite las diluciones al menos 25 veces con movimiento que describan un arco de 30 cm, evite la formación de espuma.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 4 de 8
	Enumeración de <i>Clostridium perfringens</i>	Versión: 0

- Vierta 6-7 ml de medio SFP dentro de cada una de las placas petri necesarias de acuerdo a las diluciones que se sembraran y extienda el medio en las placas. Una vez solidificado el agar rotule las placas.
- Transfiera 1 ml de cada dilución del homogenizado a cada placa petri depositándolo en el centro.
- Adicione 15 ml de agar SFP y mezcle por rotación con el inculo.
- Mezcle completamente rotando las placas sobre una superficie, primero en una dirección (Puede ser en la dirección de las agujas del reloj) y luego en dirección contraria o formando la figura del número ocho.
- Deje solidificar las placas y colóquelas en posición normal (sin invertir) dentro de la jarra para anaerobiosis. Establezca las condiciones anaeróbicas e incube a 35°C durante 20-24 horas.
- Después de la incubación remueva las placas de la jarra y cuente las placas que presentan de 20-200 colonias negras.
- Inocule 3-4 tubos de caldo de hígado picado, los cuales han sido previamente calentados durante 10 minutos en baño de agua y rápidamente enfriados sin agitación, con 2 ml del homogenizado 1:10 de la muestra e incube en incubado normal a 35°C por 24-48 horas. Descarte los tubos si el conteo en las placas ha sido positivo.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 5 de 8
	Enumeración de <i><b>Clostridium perfringens</b></i>	Versión: 0

**Prueba presuntiva de confirmación.** Ver Cuadro N° 5. <sup>(5)</sup>

- Seleccione 10 colonias típicas de ***Clostridium perfringens*** e inocularlas en igual número de tubos de caldo tioglicolato recién desaireados y enfriados.
- Incube a 35°C durante 18-24 horas.
- Examine cada cultivo con coloración de Gram ***Clostridium perfringens*** es un bacilo Gram positivo, corto y delgado. Si es necesario purificar el cultivo, siembre por estrías en cajas conteniendo agar SFP con yema de huevo. Incube en anaerobiosis 24 horas a 35°C. Este procedimiento se usa también para aislar ***Clostridium perfringens*** del caldo de hígado picado.

**Prueba presuntiva de hierro-leche.** Ver Cuadro N° 5. <sup>(5)</sup>

- Inocule 1 ml de cultivo creciendo activamente en medio tioglicolato en tubos conteniendo medio de leche y hierro e incube en baño de agua a 46°C, después de 2 horas observe una fermentación fuerte. Esta reacción se caracteriza por una coagulación rápida de la leche seguida de una fragmentación del cuajo a una masa esponjosa que se eleva por encima del medio.
- Remueva del baño los tubos positivos para evitar derrame, por esta razón es conveniente usar tubos largos.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 6 de 8
	Enumeración de <i>Clostridium perfringens</i>	Versión: 0

- Los tubos que fallan para dar una fermentación tormentosa, son negativos ***Clostridium perfringens***.

### Prueba de confirmación <sup>(5)</sup>

- Utilice el cultivo de tioglicolato para inocular en medio movilidad-nitrato y medio lactosa-gelatina, después enjuague el asa en agua tibia antes de esterilizarla en la llama para evitar dispersión.
- Incube a 35°C durante 24 horas.
- Examine los cultivos de lactosa-gelatina para la producción de gas y el cambio de color rojo a amarillo, indica producción de ácido. Enfrié los tubos 1 hora a 5°C y observe si la gelatina se ha liquificado.

***Clostridium perfringens*** es no móvil y reduce el nitrato a nitrito.

Ver Cuadro N° 5.

### Cálculos

Calcule el número de bacterias en la muestra sobre la base del porcentaje de colonias probadas que son confirmadas como ***Clostridium perfringens***. Ejemplo: si el promedio del conteo de la dilución  $10^{-4}$  fue de 85, y 8 de 10 colonias fueron confirmadas, el número de células/g de alimento es de  $85 \times (8/10) \times 10,000 = 680,000$ .

Expresar el resultado como UFC/ g o ml utilizando únicamente 2 cifras significativas.

**7. Formulario de calidad, Ver página: 182.**

**Marcha.**

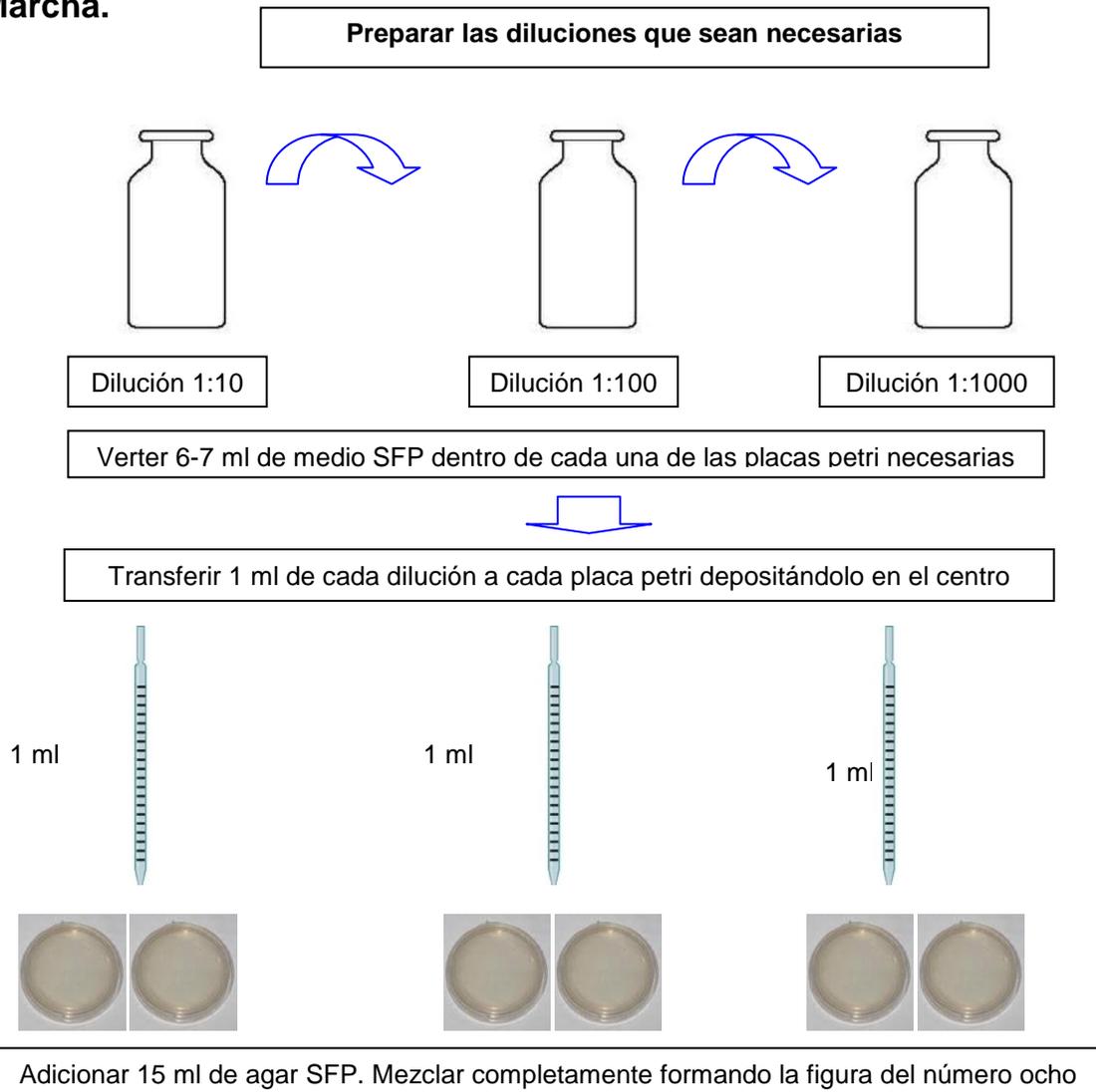
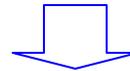


Figura N° 33. Esquema para la Enumeración de *Clostridium perfringens* 132

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 8 de 8
	Enumeración de <i>Clostridium perfringens</i>	Versión: 0



Contar las placas entre 20-200 colonias negras. Inocular 3-4 tubos de caldo de hígado picado, los cuales han sido previamente calentados durante 10 min. en baño de agua y rápidamente enfriados sin agitación, con 2 ml del homogenizado 1:10 de la muestra e incubar en incubado normal a 35°C por 24-48 horas. Descartar los tubos si el conteo en las placas ha sido positivo.



Dejar solidificar las placas y colocarlas en sin invertir dentro de la jarra para anaerobiosis. Establecer condiciones anaeróbicas e incubar a 35°C durante 20-24 horas.

Continuación de Figura N° 33

Cuadro N° 5. Resumen de pruebas para *Clostridium perfringens*

Prueba	Resultado para <i>Clostridium perfringens</i>
Movilidad	Negativa
Tinción de Gram	Bacilo Gram positivo
Nitrato	Reducción a nitritos
Gelatina	Licuefacción
SFP	Colonias negras
Coagulación fuerte de la leche	Positiva
Esporulación	Pobre

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 1 de 5
	Determinación de <i>Enterobacter sakazakii</i>	Versión: 0

## 1. Objetivo

Describir la técnica de presencia/ausencia del *Enterobacter sakazakii* en formulas lácteas y no lácteas para lactantes (0 a 12 meses) y niños pequeños (12 a 36 meses).

## 2. Alcance

Aplica a todo tipo de muestras de alimento a las q se les desee determinar la presencia del *Enterobacter sakazakii*.

## 3. Descripción y resumen del método <sup>(18)</sup>

El *Enterobacter sakazakii* es un bacilo móvil, no esporulado, Gram negativo que ha sido encontrado en fórmulas de bebés como un contaminante. Las especies de *Enterobacter* son similares bioquímicamente a *Klebsiella*, sin embargo, *Enterobacter* es ornitina positiva. *Enterobacter sakazakii* ha sido encontrado ser más resistente a los cambios osmóticos y de sequía que otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

El *Enterobacter sakazakii* es una de las bacterias oportunistas que actualmente ocupa la atención del personal de salud y empresas elaboradoras de productos lácteos desecados, por su vinculación a procesos infecciosos invasivos, con alta tasa de morbilidad y mortalidad y que dejan en algunos casos, importantes secuelas neurológicas teniendo la particularidad de estar

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 2 de 5
	Determinación de <i>Enterobacter sakazakii</i>	Versión: 0

relacionado directamente al consumo de fórmulas a base de leche en polvo, preparadas para niños lactantes. Parece tener una predisposición para infectar al sistema nervioso central, ha sido asociado con una variedad de enfermedades severas tales como sepsis generalizadas, meningitis, cerebritis, y enterocolitis necrosante.

El método consiste en pese 10 g de muestra y hacer una dilución decimal 1:10 para el previo enriquecimiento, luego el enriquecimiento y por último la identificación por medio de el método rápido API 20 E.

#### **4. Materiales y equipo**

1. Bolsas estériles whirl pack.
2. Pipetas de 1, 5 y 10 ml, graduada en unidades de 0,1 ml
3. Cuchillos, tenedores, espátulas, pinzas, tijeras, cucharas estériles
4. Placas de Petri estériles de 15 x 100 mm
5. Asas de alambre de platino de 2 mm y 3 mm de diámetro
6. Mecheros Bunsen
7. Stomacher.
8. Balanza con capacidad de 2000 g de peso y sensibilidad de 0,1 g
9. Incubadoras de  $35 \pm 2$  °C.
10. Microscopio, portaobjetos y cubreobjetos
11. Kit de Tinción

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 3 de 5
	Determinación de <i>Enterobacter sakazakii</i>	Versión: 0

## 5. Medios de cultivo

1. Agua peptonada tamponada de 90 ml.
2. Caldo de Enriquecimiento de Enterobacterias (caldo EE).
3. Agar Rojo Violeta Bilis Glucosa (VRBG).
4. Agar Trypticasa de Soya (TSA).

## 6. Procedimiento. <sup>(18)</sup>

- Pese asépticamente 10g de muestra.
- Adicione 90 ml de agua peptonada e incube por 24h a 35°C.
- Adicione 10 ml de la dilución 1:10 a 90 ml de caldo de enriquecimiento de Enterobacterias e incube por 24h a 35°C.
- Agite y estríe del caldo EE por duplicado en placas de agar VRBG para seleccionar y aislar las colonias sospechosas. Incube por 24h a 35°C.
- Seleccione las colonias que presenten una coloración rojo purpura y páselas a Agar TSA por el método de estría e incube por 48 – 72 h a 25°C.
- Después del tiempo de incubación observe las colonias que han producido un pigmento de color amarillo y realice la prueba de la oxidasa a algunas de ellas.
- El *Enterobacter sakazakii* es Oxidasa negativa.

- Haga un preparado al fresco y un frotis para tinción de Gram y obsérvelos al microscopio. RESULTADO: bacilo móvil, no esporulado, Gram negativo.

- Seleccione las colonias características y realice las pruebas bioquímicas API 20 E para su confirmación.

**7. Formulario de calidad, Ver página: 183.**

**Marcha.**

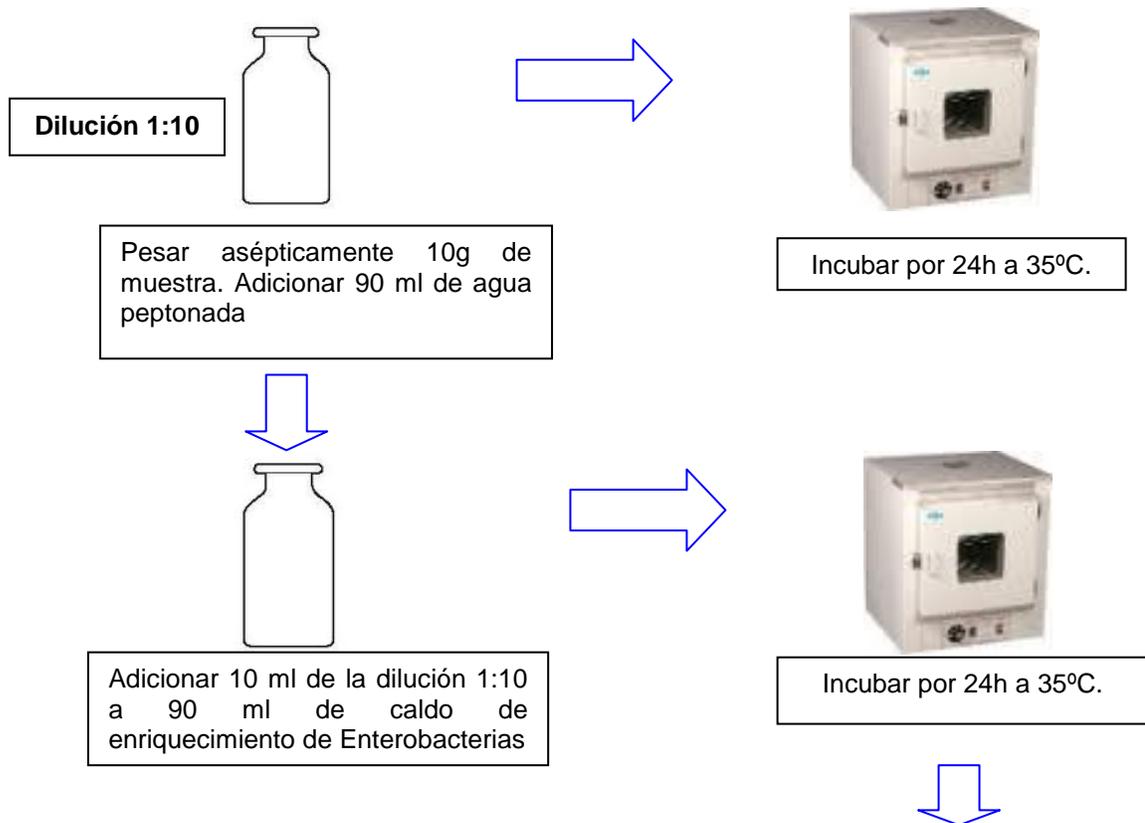
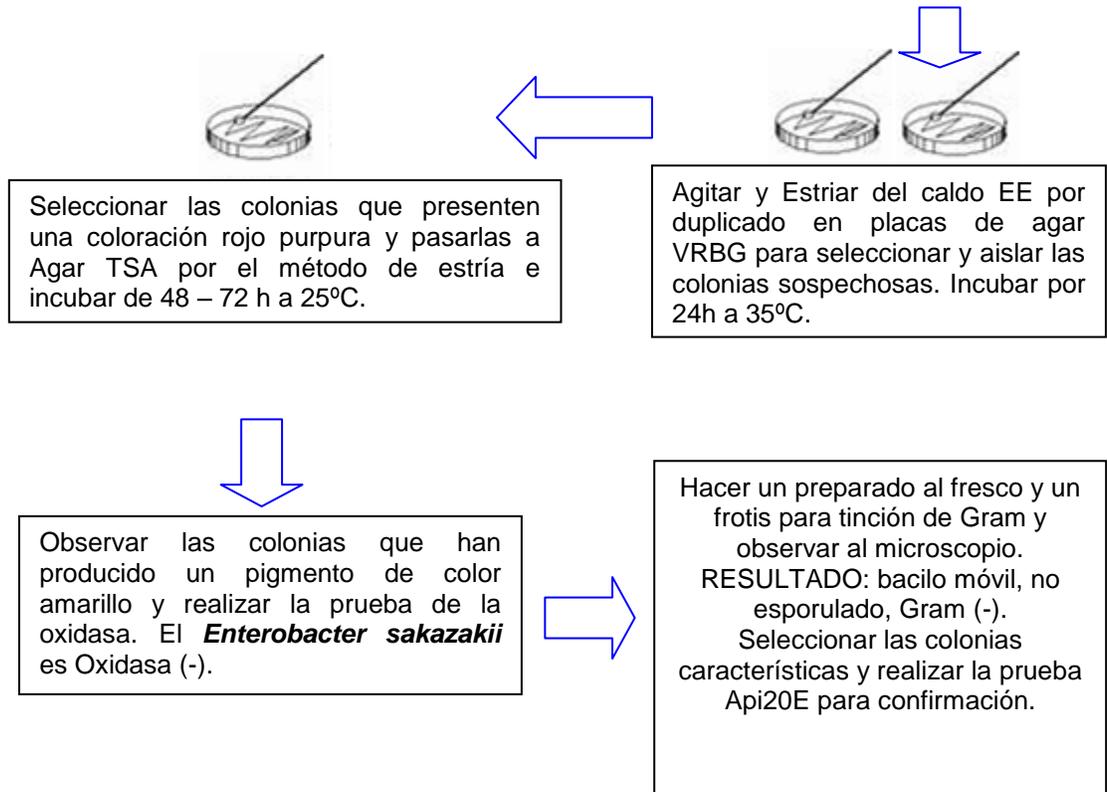


Figura N° 34. Esquema para la Determinación de *Enterobacter sakazakii*



Continuación de Figura N° 34

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 1 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> 01 y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Versión: 0

## 1. Objetivo

Describir la técnica empleada para determinar la presencia de *Vibrio cholerae* 01 y/o *Vibrio parahaemolyticus* en pescado y productos marinos frescos, congelados, incluidos los moluscos no bivalvos, crustáceos, equinodermos, descongelados, frescos y empaçados.

## 2. Alcance

Este procedimiento aplica a todo tipo de muestras a las que se les desee determinar la presencia o ausencia de *Vibrio cholerae* 01 y/o *Vibrio parahaemolyticus*.

## 3. Descripción y resumen del método <sup>(5)</sup>

Las especies de *Vibrio*, al igual que muchas bacterias Gram-negativas, crecen relativamente en la presencia de altos niveles de las sales biliares. Son anaerobios facultativos y crecen mejor en condiciones alcalinas.

*Vibrio cholerae* es el agente causante de brotes de cólera y las epidemias. Varias propiedades bioquímicas y tipos antigénicos lo caracterizan. La mayoría de cepas de *Vibrio* recuperadas de casos de cólera epidémico contienen un antígeno somático común e incluyen serogrupo O1. Hasta hace poco, sólo el serogrupo O1 se asoció con las epidemias de cólera. Numerosos casos se

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 2 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> O1 y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Versión: 0

registraron en el que los pacientes tenían los síntomas típicos del cólera clásico, *miastenia cólera*, que anteriormente sólo se ve con el serogrupo O1. Excepto para el antígeno O y la presencia de una cápsula de polisacáridos, este serogrupo es casi idéntica a la cepa séptima pandemia de *Vibrio cholerae*.

*Vibrio parahaemolyticus* es la principal causa de diarrea bacteriana asociada con el consumo de productos del mar. Es un organismo halófilas estuarios que se encuentran en las aguas costeras de prácticamente todas las regiones templadas. Todas las cepas comparten un antígeno H, pero hasta la fecha, 12 tipos O (somático) y más de 70 K (capsular) antígenos se han descrito, aunque otras muchas variedades son tipificable. La mayoría de los aislados clínicos de *Vibrio parahaemolyticus* es diferenciable de las cepas del medio ambiente por su capacidad de producir una hemolisina directa termoestable (TDH), denominado el fenómeno de Kanagawa.

### **Distribución y las fuentes de contaminación** <sup>(5)</sup>

*Vibrio cholerae* O1 se excreta en grandes cantidades en las heces de los enfermos de cólera y convalecientes. La enfermedad se transmite principalmente por vía fecal-oral, de forma indirecta a través de los suministros de agua contaminada. El contagio directo de persona a persona no es común.

Los suministros de alimentos pueden estar contaminados por el uso de las heces humanas como fertilizante o para refrescar las verduras para el mercado

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 3 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> 01 y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Versión: 0

con el agua contaminada. Los brotes de cólera en varios países y los EE.UU. Se cree que han dado como resultado del consumo de materias primas, cocida, contaminada, o mariscos contaminados.

***Vibrio parahaemolyticus*** es frecuentemente aislado de las aguas litorales y mariscos en las zonas templadas de todo el mundo. Es la causa más frecuente de las enfermedades transmitidas por los alimentos en Japón, donde muchos residentes comen pescado crudo.

El aislamiento en los alimentos se ve facilitado por el uso de medios formulados con un pH alcalino. El agua peptona buferada (APW) se utiliza comúnmente para el aislamiento de varias especies.

Los medios utilizados para la prueba las reacciones bioquímicas de ***Vibrio parahaemolyticus*** deben contener un 2% o 3% de NaCl.

El diluyente utilizado para la transferencia de células en suspensión o la preparación de dilución debe contener NaCl, por ejemplo, tampón fosfato salino (PBS).

El agar TCBS es un medio comúnmente usado para aislar ***Vibrio cholerae***, ***Vibrio parahaemolyticus***, y otras especies en pescados y productos mariscos.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 4 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> 01 y <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i>	Versión: 0

Este medio apoya el buen crecimiento de la mayoría de las especies, mientras que da inhibición de la mayoría no ***Vibrios***.

Para facilitar la identificación de aislamientos sospechoso, el kit de diagnóstico rápido de la API 20 NE se puede utilice en lugar de los medios de cultivo y las muchas bioquímicas necesarias su identificación.

#### **4. Materiales y equipo**

1. Bolsas estériles whirl pak.
2. Cuchillos, tenedores, espátulas, pinzas, tijeras, cucharas estériles.
3. Placas petri estériles.
4. Pipetas estériles graduadas de 1.0 y 10.0 ml.
5. Asas de alambre de platino de 2 mm y 3 mm de diámetro
6. Mecheros Bunsen
7. Stomacher.
8. Balanza con capacidad de 2000 g de peso y sensibilidad de 0,1 g
9. Incubadora a 35 ° C

#### **5 Medios y Reactivos**

1. Agua peptonada alcalina (APW)
2. Arginina glucosa inclinado (AGS)
3. Medio de ensayo de Motilidad -1% NaCl

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 5 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> 01 y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Versión: 0

4. Reactivo de Oxidasa (1% de N, N, N, N'-tetrametil-p-fenilendiamina 0,2 HCl en H<sub>2</sub>O)
5. Buffer Fosfato salino (PBS)
6. Solución Salina - 0,85% en H<sub>2</sub>O
7. Solución de NaCl al 2%
8. Desoxicolato de sodio - 0,5% en H<sub>2</sub>O estéril
9. Agar Tiosulfato citrato sales biliares sacarosa (TCBS)
10. Agares T<sub>1</sub> N<sub>1</sub> y T<sub>1</sub> N<sub>3</sub> (1% de triptona y 1% o 3% de NaCl)
11. Caldos T<sub>1</sub> N<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> N<sub>3</sub>, T<sub>1</sub> N<sub>6</sub>, T<sub>1</sub> N<sub>8</sub>, T<sub>1</sub> N<sub>10</sub> caldos
12. Tríptico de soja agar (TSA) o caldo triptico de soja (TSB) (con adición de NaCl, 2%).
13. TSB-1% NaCl-24% de glicerol
14. Caldo de urea (o la urea agar Christensen con adición de NaCl (2%)
15. Antisuero *V. cholerae* O1 y O139.
16. API 20 NE tiras y reactivos de diagnóstico

## PROCEDIMIENTOS:

### *Vibrio cholerae*

#### A. Enriquecimiento y siembra. <sup>(5)</sup>

- Pese 25 g de muestra en una bolsa estéril. Productos como el marisco o verduras pueden ser mezcladas o cortadas en trozos pequeños.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 6 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> 01 y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Versión: 0

- Añada 225 ml de APW. Homogenice la muestra en el Stomacher.
- Incube en APW a  $35 \pm 2$  °C durante 6 a 8 h. Vuelva a incubar la bolsa de un día para otro si la muestra se ha procesado de alguna manera. Para el análisis de ostras crudas, se deben pasar por un matraz tarado unos segundos con 25 g de producto y con 2475 ml de APW. Después incube de 18 a 21 horas a  $42 \pm 0,2$  °C en un baño de agua.
- Transfiera un asa llena de 3 mm de la película superficial del APW a la superficie de una placa seca TCBS y estríe para obtener colonias aisladas.
- Incube TCBS de 18 a 24 h, a  $35 \pm 2$  °C.
- Las colonias típicas de *Vibrio cholerae* en agar TCBS son grandes (de 2 a 3 mm), lisas, amarillas y ligeramente aplanada con los centros y las periferias opaco translúcido. Ver Figura N° 37.
- Para la identificación bioquímica, las colonias de las placas deben ser sembradas a un agar no selectivo ( $T_1 N_1$ ,  $T_1 N_3$  o Agar TSA-2% de NaCl) para purificar. Incube de 18 a 24 h, a  $35 \pm 2$  °C.
- Subcultive tres o más colonias típicas por medio de estrías a agar inclinado  $T_1 N_1$  o al medio de prueba motilidad por medio de una punción. Incube de 18 a 24 h, a  $35 \pm 2$  °C.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 7 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> 01 y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Versión: 0

## B. Detección y confirmación <sup>(5)</sup>

### Medio inclinado Arginina Glucosa.

- Inocule cada sospecho del cultivo de T<sub>1</sub> N<sub>1</sub> a AGS extendiendo en el bisel y punzando al fondo.
- Incube con la tapa floja de 18 a 24 h, a 35 ° ± 2 °C.
- La colonias de *Vibrio cholerae* tendrán un bisel alcalino (púrpura) y un fondo ácido (amarillo), como la arginina no se hidroliza. No se produce gas o H<sub>2</sub>S.

### Tolerancia a la sal.

- Del cultivo de T<sub>1</sub> N<sub>1</sub>, inocule un tubo de cada uno de los caldos de T<sub>1</sub> N<sub>0</sub> y T<sub>1</sub> N<sub>3</sub>. Incube los tubos de 18 a 24 h a 35° ± 2°C. *Vibrio cholerae* crecerá sin NaCl.

### Prueba del hilo.

- La prueba del hilo es una prueba útil para la presunta colonia de *Vibrio cholerae* ya que todas las cepas dan positiva a la prueba.
- Emulsione una gran colonia del cultivo de agar T<sub>1</sub> N<sub>1</sub> en una pequeña gota de desoxicolato de sodio al 0,5% en H<sub>2</sub>O destilada estéril. Dentro de los 60

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Pagina 8 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> 01 y <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i>	Versión: 0

segundos se da la lisis de las células (pérdida de turbidez) y de las cadenas de ADN, levante con un asa y se forma un hilo (hasta 2 a 3 cm).

### Reacción oxidasa.

- Transfiera del cultivo de T<sub>1</sub> N<sub>1</sub> un poco de crecimiento con un alambre de platino (alambre de níquel-cromo no debe usarse) o con un aplicador de madera y aplicarlo a un papel filtro saturado con el reactivo de oxidasa (1% de N, N, N, N'-tetrametil-p-fenilendiamina. 2HCl).
- Un color púrpura oscuro que se desarrolla dentro de 10 segundos indica un crecimiento positivo de la prueba.

El *Vibrio cholerae* es oxidasa positiva.

### Prueba serológica de aglutinación.

- Para cada colonia, marque tres secciones (con lápiz de cera) de 1 x 2 cm en el interior de un plato de Petri de vidrio o en un portaobjetos de vidrio de 2 x 3 pulgadas y añada una gota de 0,85% de solución salina en la parte inferior de la cada uno marcado sección.
- Con el asa estéril o una aguja, emulsione la colonia de T<sub>1</sub>N<sub>1</sub> en la solución salina de una sección y repita para cada sección.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 9 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> O1 y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Versión: 0

- Compruebe si hay aglutinación.

- Añada una gota del antisuero polivalente *Vibrio cholerae* O1 a un sector de la colonia y la mezcla emulsionada con un asa estéril o una aguja. Añada una gota de anti-O139 a una sección separada.

- Inclínala de la mezcla de un lado a otro durante un minuto y observe contra un fondo oscuro. Una reacción positiva se indica mediante una aglutinación rápida, fuerte en un fondo claro.

**7. Formulario de calidad, Ver página: 184.**

***Vibrio parahaemolyticus*. Método NMP.** <sup>(5)</sup>

**Mariscos: Enriquecimiento, aislamiento y enumeración.**

- Pese 50 g de muestra de mariscos. Obtenga superficie de los tejidos, branquias e intestino de los peces. Para las muestras que son moluscos utilice la carne y el líquido.

- Mezcle y homogenice

- Para los crustáceos como el camarón, utilice el animal entero si es posible, y si es demasiado grande, seleccione la parte central, incluidas las agallas y la tripa.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 10 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> 01 y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Versión: 0

- Añada 450 ml de agua de dilución de PBS y mezcle durante 1 min. Esto constituye la dilución 1:10.
- Prepare 1:100, 1:1000, 1:10,000 diluciones o más, si es necesario, en PBS.
- Inocule 3 porciones x 10 ml de la dilución 1:10 en 3 tubos con 10 ml de 2 x APW (doble fuerza). Esto representa la porción de 1 g. Del mismo modo, inocular 3 x 1 ml de la 1:10, 1: 100, 1: 1000 y 1: 10.000 diluciones en 10 ml de una sola fuerza APW. Si un alto número de *Vibrio parahaemolyticus* se espera, el examen puede empezar a las 1:10 de la dilución del producto.
- Incube el APW toda la noche a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$ .
- Extienda con ayuda de una asa de la parte superior de 1 cm de la superficie de los tubos que contienen APW las tres mayores diluciones de la muestra la cual mostró un crecimiento en agar TCBS
- Incube las placas de TCBS a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$ .

Lectura: Las colonias de *Vibrio parahaemolyticus* en agar TCBS son redondas, opacas, verdes o azules, de 2 a 3 mm de diámetro.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 11 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> 01 y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Versión: 0

### DetECCIÓN Y CONFIRMACIÓN <sup>(5)</sup>

- Para la identificación bioquímica de los aislamientos todos los medios de cultivo deben de contener un 2% o 3% de NaCl.
- Prepare una suspensión de las colonias sospechosas en NaCl al 2% para el API 20 NE.
- Transfiera dos o más colonias sospechosas del agar TCBS con una aguja para el medio inclinado Arginina Glucosa (AGS).
- Puncé al fondo y estríe por la inclinación, incube con la tapa suelta toda la noche a  $35 \pm 2$  ° C.

El *Vibrio parahaemolyticus* produce un fondo ácido (amarillo) y un bisel alcalino (púrpura), sin producción de gas o H<sub>2</sub>S en AGS.

- Para TSB y TSA inclinado (suplementado con 2% de NaCl), inocule los medios e incube durante una noche a  $35 \pm 2$  ° C. Estas colonias son inóculos para otras pruebas, así como material para la tinción de Gram para el examen microscópico.

El *Vibrio parahaemolyticus* es oxidasa positiva, Gram negativo, organismo pleomórfico y exhibe curvas o barras rectas con flagelos polares.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 12 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> 01 y <i>Vibrio paraahaemolyticus</i>	Versión: 0

- Inocule un tubo de prueba de movilidad por punción con asa a la columna del medio, a una profundidad de aproximadamente 5 cm.

- Incube toda la noche a  $35 \pm 2$  ° C.

El *Vibrio paraahaemolyticus* es móvil.

En los aislamientos de *Vibrio paraahaemolyticus* debe hacerse la prueba para detectar la presencia de ureasa, para cualquiera utilizando caldo urea suplementado con 2% de NaCl o en agar urea Christensen suplementado con NaCl al 2% o utilizando API 20 NE.

La reacción de la ureasa es una prueba valiosa para las cepas potencialmente patógenos.

- Inocule el caldo de urea con NaCl al 3% con crecimiento de TSA o TSB.

- Incube a  $35 \pm 2$  ° C por 18-24 h.

La producción de ureasa está determinada por la presencia de un color rosa en el medio (alcalino).

- Incube los cultivos negativos un adicional de 24 h para las cepas raras, de lenta producción de ureasa.

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 13 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> O1 y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Versión: 0

Cuando las colonias están finalmente identificadas bioquímicamente como *Vibrio parahaemolyticus* se refieren a las diluciones positivas originales en el caldo de enriquecimiento. Entonces aplique la tabla NMP para 3 tubos para el recuento final del organismo. Ver Tabla N° 1.

## 7. Formulario de calidad, Ver página: 185.

### Marchas.

#### Determinación de *Vibrio cholerae* O1 <sup>(5)</sup>

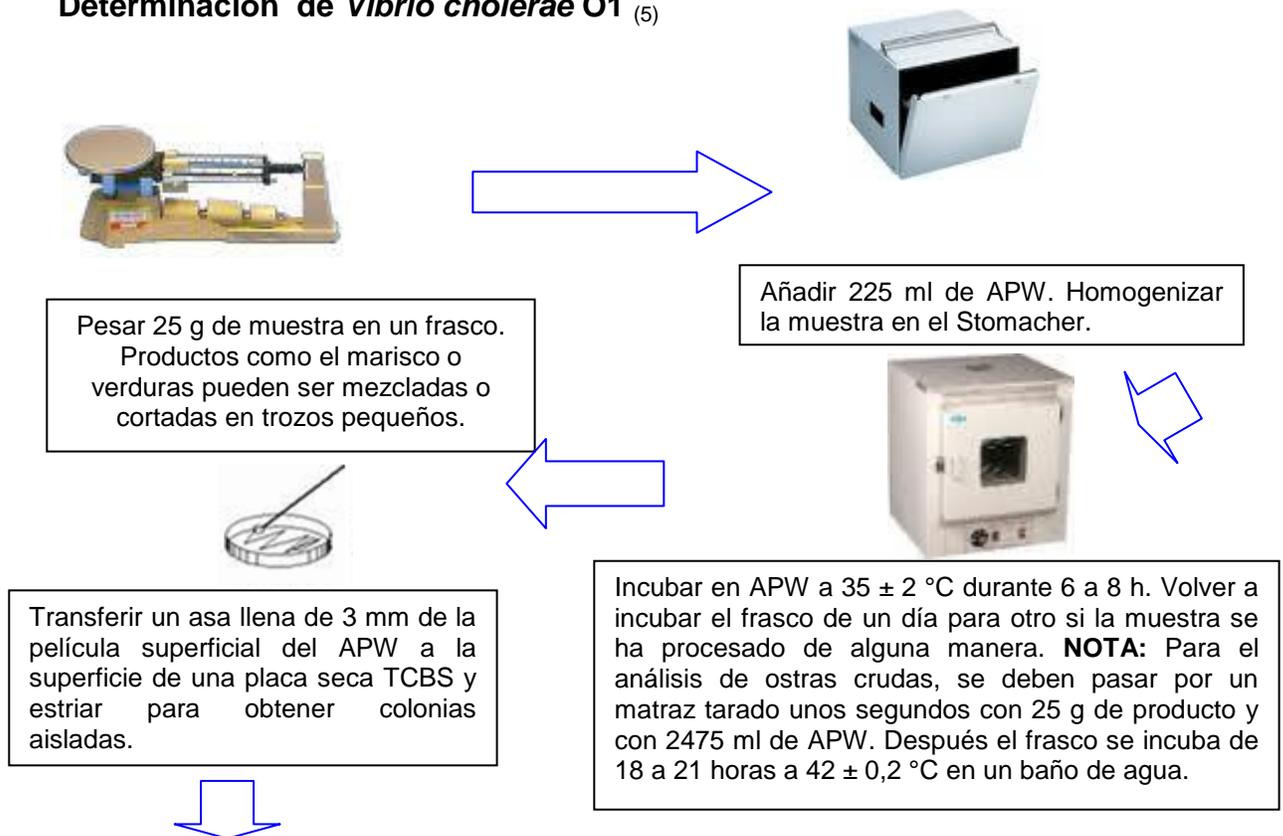
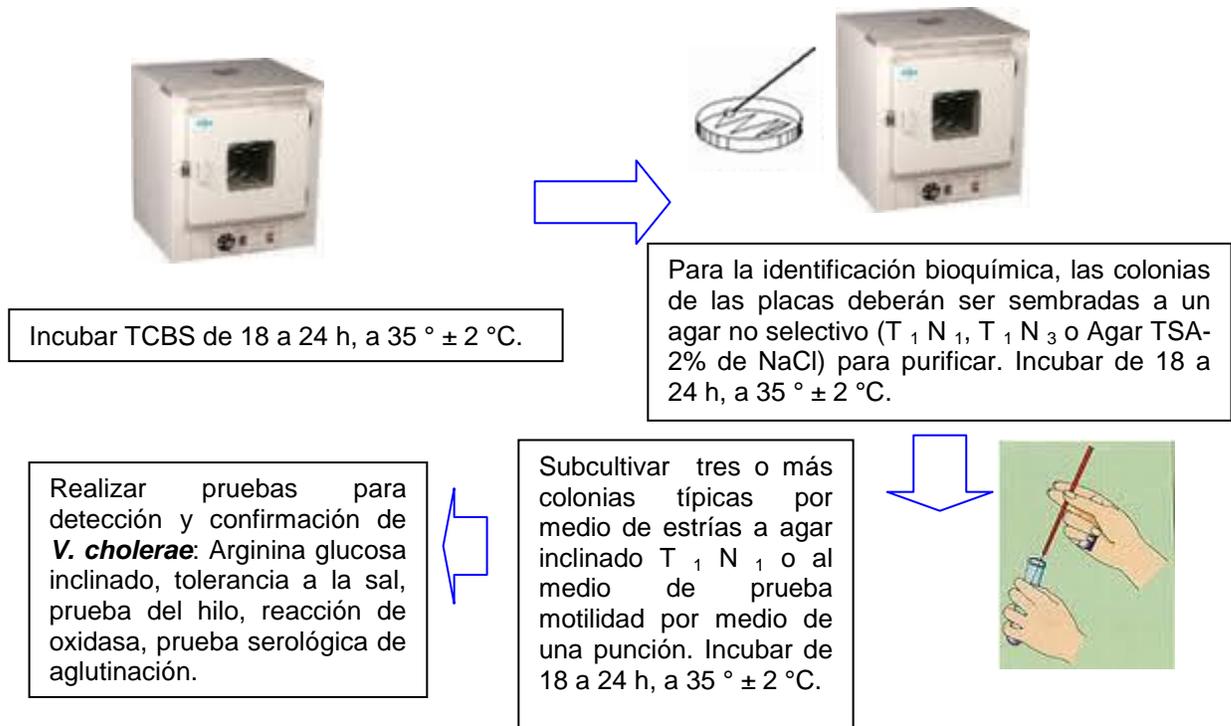


Figura N°35. Esquema para la Determinación de *Vibrio cholerae* O1

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 14 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> 01 y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Versión: 0



Continuación de Figura N°35

### Identificación de *Vibrio parahaemolyticus* en mariscos (Método NMP)

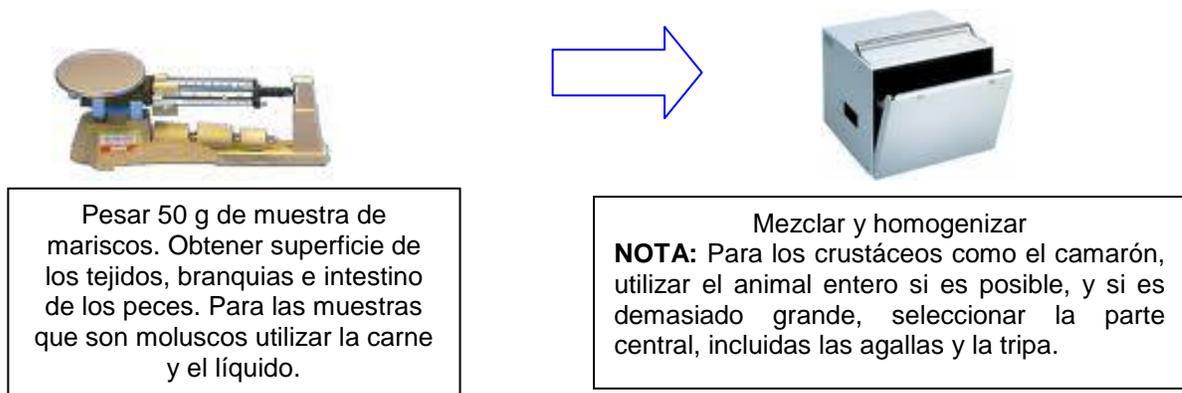
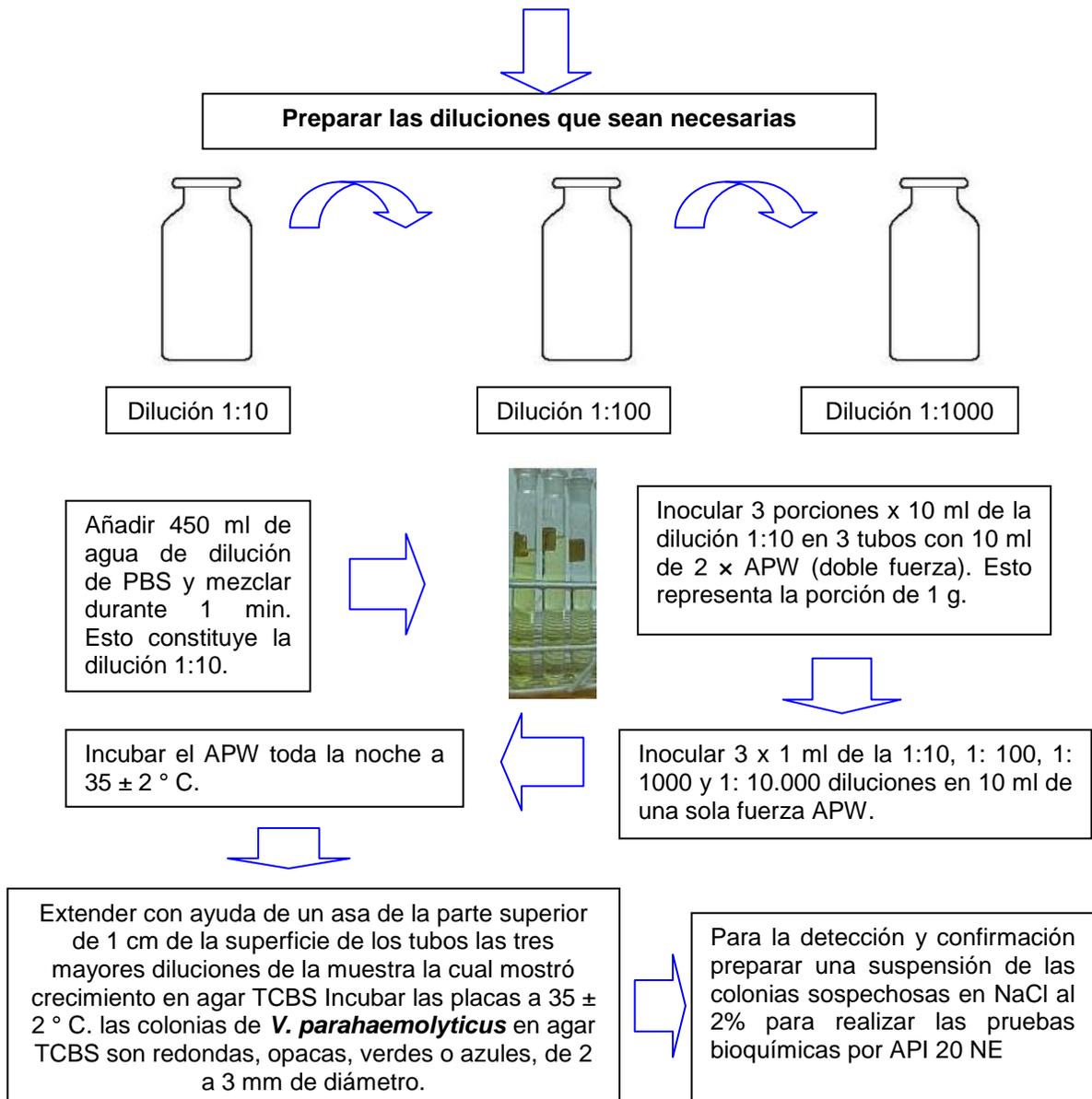


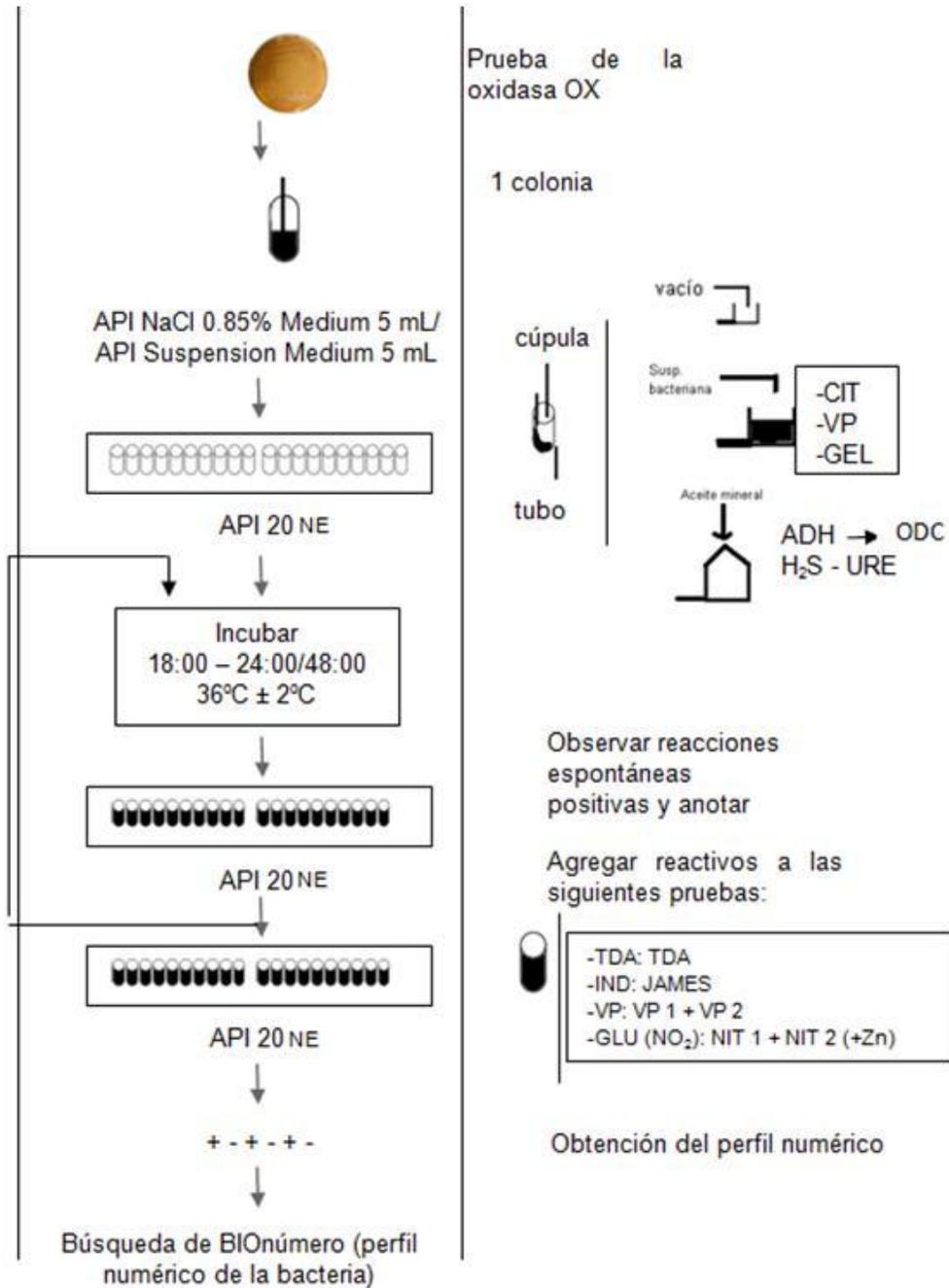
Figura N°36. Esquema para la Identificación de *Vibrio parahaemolyticus* en mariscos

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 15 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> 01 y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Versión: 0



Continuación de Figura N° 36

**Identificación bioquímica de *V. parahaemolyticus* por API 20 NE <sup>(5)</sup>**



Continuación de Figura N° 36

	<b>UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR</b> <b>FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA</b> <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	Página 17 de 17
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> 01 y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Versión: 0

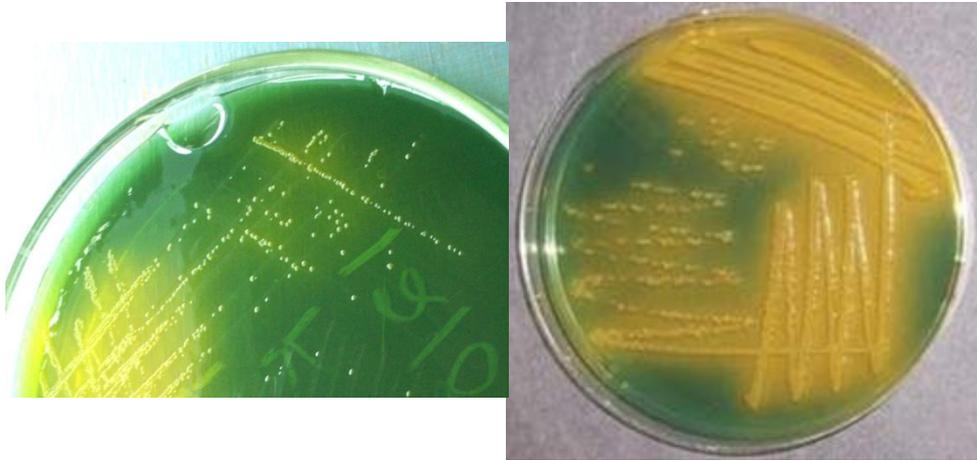


Figura N° 37. Colonias características de *Vibrio cholerae* en Agar TCBS

## RECEPCION DE MUESTRA

La cantidad de muestra de alimento necesaria para efectuar el análisis debe de ser una cantidad mínima de 100g en el caso de alimentos sólidos y semisólidos; y 200ml para los líquidos.

Cuando se trate de productos alimenticios cuyo peso o volumen sea menor que la cantidad de muestra mínima requerida, se pueden tomar varias unidades del mismo lote, las cuales se deberán combinar al momento de la ejecución del ensayo.

En el caso de los alimentos listos para consumir como por ejemplo un plato de arroz, ensalada y carne, la muestra a analizar será el plato servido y los análisis se deben ajustar al peso total del plato, con respecto a los análisis solicitados.

## **CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS (2)**

**Grupo 1 - Leche y productos lácteos:** (2)

1.1 Subgrupo del alimento: Leche fluida pasteurizada con o sin saborizantes, con o sin aromatizantes						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	A	2	5	0	----	< 3 NMP/ml
<i>Salmonella spp/25 g</i>		2		0	---	Ausencia
<i>Listeria monocytogenes/25 g</i>		2		0	---	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		2	10 UFC/ml	10 <sup>2</sup> UFC/ml

1.2 Subgrupo del alimento: Leche UAT (UHT) y crema UAT (UHT) en empaque aséptico						
Parámetro	Plan de Muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
Recuento de aerobios mesófilos (previa incubación a 35 °C por 10 días)	A	2	5	0	----	<10 UFC/ml

1.3 Subgrupo del alimento: Leche condensada, evaporada y dulce de leche						
Parámetro	Plan de Muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
Recuento de anaerobios mesofilos (para leche evaporada)	C	2	5	0	----	<10 UFC/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> (para leche condensada y dulce de leche)		3	5	2	10 UFC/g	100 UFC/g

1.4 Subgrupo del alimento: Leche en polvo, mezcla en polvo para helados y crema en polvo						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Salmonella spp/25 g</i>	A	2	5	0	---	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Escherichia coli</i>		2		0	----	< 3 NMP/g

1.5 Subgrupo del alimento: Crema Dulce, Crema Acida (natilla), crema batida						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	m	M
<i>Salmonella spp</i> /25 g	A	2	5	0	---	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
Coliformes fecales		2		0	----	< 3 NMP/g
<i>Escherichia coli</i>		2		0	----	< 3 NMP/g
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g		2		0	---	Ausencia

1.6 Subgrupo del alimento: Similares de Crema Dulce, Crema Acida (natilla), crema batida						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	m	M
<i>Salmonella spp</i> /25 g	A	2	5	0	---	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
Coliformes fecales		2		0	----	< 3 NMP/g
<i>Escherichia coli</i>		2		0	----	< 3 NMP/g
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g		2		0	---	Ausencia

1.7 Subgrupo del alimento: Mantequilla y Mantequilla con Especies (grasa butírica)						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	m	M
<i>Salmonella spp</i> /25 g	A	2	5	0	---	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
Coliformes fecales		3		2	3 NMP/g	9.4 NMP/g
<i>Escherichia coli</i>		2		0	----	< 3 NMP/g
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g		2		0	---	Ausencia

1.8 Subgrupo del alimento: Quesos madurados y procesados						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
Coliformes fecales	A	2	5	0	---	< 10 UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 <sup>2</sup> UFC/g	10 <sup>3</sup> UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g		2		0	---	Ausencia
<i>Salmonella spp.</i> /25 g		2		0	---	Ausencia

1.9 Subgrupo del alimento: Quesos frescos, no madurados y requesón						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
Coliformes fecales	A	3	5	1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Escherichia coli</i>		2		0	-----	< 10 UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 <sup>2</sup> UFC/g	10 <sup>3</sup> UFC/g
<i>Salmonella spp</i> /25 g		2		0	----	Ausencia
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g		2		0	---	Ausencia

1.10 Subgrupo del alimento: Yogurt						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
Recuento de mohos y levaduras	A	3	5	2	10 UFC/g	100 UFC/g
Coliformes fecales				0	-----	<3 NMP/g

1.11 Subgrupo del alimento: Helados a base de leche						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	A	2	5	0	----	< 3 NMP/g
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Salmonella spp</i> /25 g		2		0	----	Ausencia
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g		2		0	----	Ausencia

## Grupo 2 - Grasas y aceites y emulsiones grasas <sup>(2)</sup>

2.1 Subgrupo del alimento: Margarina y grasas emulsionadas						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	C	2	5	0	< 3 NMP/g	----
<i>Salmonella ssp</i> /25 g (solo si contiene leche o especies)		2		0	Ausencia	----
<i>Staphylococcus aureus</i> (Solo para productos que contienen leche y especies)		3		2	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g (Solo para productos que contienen leche)		2		0	Ausencia	----

## Grupo 3 - Hielos <sup>(2)</sup>

3.1 Subgrupo del alimento: Hielo comestible						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	A	2	5	0	< 1.1 NMP/100 ml	----

3.2 Subgrupo del alimento: Helados a base de agua						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	M	M
<i>Escherichia coli</i>	B	2	5	0	<3 NMP/g	---

## Grupo 4 - Frutas y hortalizas <sup>(2)</sup>

4.1 Subgrupo del alimento: Frutas y hortalizas frescos						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	C	m	M
<i>Escherichia coli</i>	C	3	5	2	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g (solo para productos de consumo crudo)		2		0	Ausencia	---
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	---

4.2 Subgrupo del alimento: Frutas y hortalizas procesados						
4.2.1 Frutas y hortalizas congelados						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	C	m	M
<i>Escherichia coli</i>	B	2	5	0	< 3 NMP/g	---
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	---
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g		2		0	Ausencia	---

4.2.2 Frutas y hortalizas desecados o deshidratados						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	B	2	5	0	< 3 NMP/g	---
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	---

4.2.3 Conservas hortalizas y frutas enlatadas						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	m	M
Recuento de aerobios mesófilos (previa incubación a 35 °C por 10 días) Para productos con pH < 4.5	B	2	5	0	< 10 UFC/g	---
Recuento de anaerobios mesófilos (previa incubación a 35 °C por 10 días). Para productos con pH > 4.5	B	2	5	0	< 10 UFC/g	----

4.2.4 Jaleas, mermeladas y rellenos de frutas para pastelería						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	m	M
<i>Salmonella ssp</i> /25 g	C	2	5	0	Ausencia	----

4.2.5 Mantequilla de maní						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	m	M
<i>Salmonella ssp</i> /25 g	C	2	5	0	Ausencia	----

## Grupo 5 - Productos de confitería <sup>(2)</sup>

5.1 Subgrupo del alimento: Productos de cacao, chocolate y derivados (Imitación y sucedáneos)						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	m	M
<i>Salmonella ssp</i> /25 g	C	2	5	0	Ausencia	----

5.2 Subgrupo del alimento: Otros productos de azúcar						
5.2.1 Turriones, mazapán y dulces típicos						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	m	M
<i>Salmonella ssp</i> /25 g (solo los que contiene huevo)	B	2	5	0	Ausencia	----
<i>Staphylococcus aureus</i> (solo para los que contienen leche)		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Escherichia coli</i>		2		0	< 3 NMP/ g	----

## Grupo 6 - Cereales y derivados <sup>(2)</sup>

6.1 Subgrupo del alimento: Cereales en hojuelas y polvo; mezclas para refresco y cereales para desayuno.						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	C	2	5	0	<3 NMP/ g	----
<i>Salmonella ssp</i> /25 g (solo para los que contienen frutas y semillas secas)		2		0	Ausencia	----

6.2 Subgrupo del alimento: Pastas (rellenas)						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite por	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Staphylococcus aureus</i>	C	3	5	1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Salmonella ssp</i> /25 g (para los que contengan huevo)		2		0	Ausencia	----

## Grupo 7 - Pan y productos de panadería y pastelería <sup>(2)</sup>

7.1 Subgrupo del alimento: Pan, productos de panadería ordinaria y mezclas en polvo (frescos o congelados).						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	B	2	5	0	< 3 NMP/ g	----

**7.2 Subgrupo del alimento: Panadería fina con o sin relleno (galletas, queque, pasteles, tortas) otros productos de panadería fina (dulces, salados, aromatizados) y mezclas.** Incluye otros productos de panadería fina como donas, panecillos dulce y muffins, frescos o congelados.

Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	B	2	5	0	< 3 NMP/g	----
<i>Staphylococcus aureus</i> (productos rellenos de derivado lácteo)		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Salmonella ssp</i> /25g (productos rellenos de derivados lácteos, cacao y carne)		2		0	Ausencia	----

## Grupo 8 - Carnes y productos cárnicos (2)

**8.1 Subgrupo del alimento: Productos cárnicos crudos (empacados y sin empacar). No incluidas materias primas.**

**8.1.1 Subgrupo del alimento: Productos cárnicos crudos diferentes al pollo**

Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i> O157H7 /25g (carne molida, picada y tortas para hamburguesas)	A	2	5	0	Ausencia	---
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	---
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g		2		0	Ausencia	---
<i>Escherichia coli</i>		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC /g

**8.2 Subgrupo del alimento: Productos cárnicos cocidos y curados (embutidos)**

Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	A	2	5	0	< 10 UFC/g	---
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	---
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g		2		0	Ausencia	---
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Clostridium perfringens</i>		3		2	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g

8.3 Subgrupo del alimento: Carnes curadas crudas (chorizos)						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	A	3	5	2	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	---
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g		2		0	Ausencia	---
<i>Clostridium perfringens</i>		3		2	10 UFC/g	10 <sup>3</sup> UFC/g

8.4 Subgrupo del alimento: Carnes congelados, incluyendo empanizados y rebozados						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	C	m	M
<i>Escherichia coli</i>	A	2	5	0	10 UFC/g	----
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	---
<i>Staphylococcus aureus</i> (Solo para carne de aves)		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Clostridium perfringens</i>		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g

8.5 Subgrupo del alimento: Carnes enlatadas						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	C	m	M
Recuento de anaerobio mesófilo. Previa incubación a 35 °C/10 días.	A	2	5	0	< 10 UFC/g	---

## Grupo 9 - Pescados, derivados y productos marinos <sup>(2)</sup>

9.1 Subgrupo del alimento: Pescado y productos marinos frescos, congelados, incluidos moluscos no bivalvos, crustáceos y equinodermos, desconchados, frescos, empacados						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	A	3	5	3	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i> (Solo para pescados)		3		1	10 UFC/g	10 <sup>3</sup> UFC/g
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	---
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g (solo para producto crudo listo para consumo, ejemplo sushi y ceviche)		2		0	Ausencia	---
<i>Vibrio cholerae</i> O1		2		0	Ausencia	-----
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (solo para bivalvos)		3		2	10 UFC/g	10 <sup>3</sup> UFC/g

**9.2 Subgrupo del alimento: Pescado y crustáceos, precocidos, cocidos, salados y ahumados.**

Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	A	2	5	0	< 3 NMP/g	----
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		2	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	---
<i>Listeria monocytogenes</i> /25g (productos cocidos)		2		0	Ausencia	---

**9.3 Subgrupo del alimento: Moluscos bivalvos y crustáceos pasteurizados o cocidos**

Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	A	2	5	0	< 3 NMP/g	-----
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	---
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g		2		0	Ausencia	---

**9.5 Subgrupo del alimento: Pescados, moluscos, equinodermos y crustáceos enlatados.**

Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
Recuento de aerobios mesófilo. Previo incubación a 35 C/10 días.	A	2	5	0	< 10 UFC/g	-----
Recuento de anaerobio mesófilo. Previo incubación a 35 °C/10 días.		2		0	< 10 UFC/g	-----

**Grupo10 - Huevos y derivados (2)**

**10.1 Subgrupo del alimento: Huevo entero, claras, yemas; pasteurizados líquidos o deshidratados.**

Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	A	2	5	0	<3 NMP/g	-----
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	-----

**10.2 Subgrupo del alimento: huevos frescos en su cáscara.**

Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Salmonella ssp</i> /25 g	A	2	5	0	Ausencia	-----

**Grupo11 - Endulzantes o edulcorantes incluida la miel de abeja.** (2)

11.0 Grupo de alimentos: Endulzantes , edulcorantes, incluida la miel						
11.1 Subgrupo de alimento: Miel y Jarabes (syrup)						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
Recuento de bacterias anaerobios sulfito reductoras (solo para miel de abejas)	C	3	5	1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g

**Grupo12 - Salsas, aderezos, especias y condimentos** (2)

12.1 Subgrupo del alimento: Mayonesas y aderezos (en base a huevo)						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Salmonella ssp</i> /25 g	B	2	5	0	Ausencia	----
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g

12.2 Subgrupo del alimento: Especias, hierbas desecadas, consomé y condimentos						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Staphylococcus aureus</i> (aplica para consomés y condimentos)	C	3	5	1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	----

12.3 Subgrupo del alimento: Salsas de tomate, mostaza y salsas para sazonar						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	C	2	5	0	< 3 NMP/g	----
<i>Salmonella ssp</i> /25 g (salsas para sazonar)		2		0	Ausencia	----

### Grupo13 - Alimentos para usos nutricionales especiales <sup>(2)</sup>

13.1 Subgrupo del alimento: Fórmulas lácteas y no lácteas para lactantes (de 0 a 12 meses) y niños pequeños (12 a 36 meses)						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	m	M
<i>Staphylococcus aureus</i> (para fórmula láctea)	A	2	5	0	<10 UFC/g	----
<i>Salmonella spp</i> /25 g		2		0	Ausencia	----
<i>Listeria monocytogenes</i> /25g		2		0	Ausencia	----
<i>Enterobacter sakasaki</i> /10g (para formula láctea)		2		0	Ausencia	----

13.2 Subgrupo del alimento: alimentos complementarios para niños de pecho (0 a 6 meses) y niños pequeños (12 a 36 meses)						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	C	m	M
Recuento aerobios mesófilas (serán los únicos análisis para productos envasados y enlatados) Previo incubación 35°C / 10 días	A	2	5	0	< 10 UFC/ mL o g	----
Recuento anaerobios mesófilas (serán los únicos análisis para productos envasados y enlatados) Previo incubación 35°C / 10 días		2		0	<10 UFC/mL o g	----
<i>Salmonella spp</i> / 25g (cuando contenga carne )		2		0	Ausencia	----
<i>Bacillus cereus</i> (cuando contenga cereales y leche)		2		0	< 10 UFC/mL o g	----
<i>Staphylococcus aureus</i>		2		0	< 10 UFC/ml o g	----
Enterobacterias		2		0	< 10 UFC/mL o g	----

### Grupo14 - Bebidas No Alcohólicas <sup>(2)</sup>

14.1 Subgrupo del alimento: Bebidas envasadas no carbonatadas (jugos pasteurizados, productos concentrados).						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	C	2	5	0	< 3 NMP/ml	-----

14.2 Subgrupo del alimento: Néctares						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite -	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	C	2	5	0	<3 NMP/ml	-----

14.3 Subgrupo del alimento: Jugos y bebidas artificiales no pasteurizados						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	B	2	5	0	< 3 NMP/mL	-----
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	-----

14.4 Subgrupo del alimento: Agua envasada						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Coliformes Totales</i>	A	2	5	0	< 1.1 NMP/100 mL	-----
<i>Escherichia coli</i>		2		0	< 1.1 NMP/100 mL	-----
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		2		0	Ausencia	-----

14.5 Subgrupo del alimento: Té y hierbas para infusión						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	Clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	C	2	5	0	< 3 NMP/ g	----
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	----

## Grupo15 - Bocadillos o boquitas <sup>(2)</sup>

15.1 Subgrupo del alimento: Frituras y bocadillos (snacks)						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	C	2	5	0	< 3 NMP/ g	----
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	----
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g

15.2 Subgrupo del alimento: Semillas y nueces						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	B	2	5	0	< 3 NMP/ g	----
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	----

**Grupo 16 - Caldos, sopas, cremas y mezclas deshidratadas** (2)

16.1 Subgrupo del alimento: Caldos, sopas, cremas, salsas y puré de papas deshidratadas instantáneas						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	C	2	5	0	< 3 NMP/ g	----
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Salmonella ssp/25 g</i>		2		0	Ausencia	----

16.2 Subgrupo del alimento: Caldos, sopas, cremas, salsas y puré de vegetales deshidratados que requieren cocción						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	C	2	5	0	< 3 NMP/ g	-----
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Salmonella ssp/25 g</i>		2		0	Ausencia	-----

16.3 Subgrupo del alimento: Mezclas en seco instantáneas para postres (flanes, pudines y gelatinas).						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Staphylococcus aureus</i> (postres que contengan leche)	C	3	5	2	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Bacillus cereus</i> (para productos que contienen leche).		3		1	10 UFC/g	10 <sup>3</sup> UFC/g
<i>Salmonella ssp/25 g</i>		2		0	Ausencia	-----

**Grupo 17 - Alimentos listos para consumir** (2)

17.1 Subgrupo del alimento: Alimentos preparados, listos para consumir que no requiere tratamiento térmico						
Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	A	2	5	0	< 3 NMP/ g	-----
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Salmonella ssp/25 g</i>		2		0	Ausencia	-----
<i>Clostridium perfringens</i> (productos con carne)		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g		2		0	Ausencia	-----

**17.2 Subgrupo del alimento: Alimentos preparados, listos para consumir que requiere tratamiento térmico**

Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	A	2	5	0	3 NMP/ g	-----
<i>Staphylococcus aureus</i>		3		2	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	-----
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g		2		0	Ausencia	-----
<i>Clostridium perfringens</i> (productos con carne)		3		1	10 UFC/g	10 <sup>2</sup> UFC/g

**17.3 Subgrupo de Alimentos: Tamales, tortillas ( trigo, maíz), pupusas.**

Parámetro	Plan de muestreo				Límite	
	Tipo de riesgo	clase	n	c	m	M
<i>Escherichia coli</i>	B	2	5	0	<3 NMP/g	---
<i>Salmonella ssp</i> /25 g		2		0	Ausencia	---

## FORMULARIOS DE CALIDAD

Los formularios de calidad son una herramienta creada con el propósito de facilitar los análisis de algún tipo de alimento, ya que en el se anotan todas las lecturas, reacciones y resultados finales de una muestra para cada tipo de microorganismo.

Los formularios de calidad comprenden:

- Encabezado: UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR, SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA, el logo de la facultad y la determinación a la que pertenece.
- Identificación de la muestra, donde se coloca lo referente a la muestra como por ejemplo, el tipo de alimento, código, etc.
- Resultados. En el área de resultados se anotan los datos obtenidos en el ensayo, tales como:
  - Tipo de crecimiento en caldo de enriquecimiento. Se anota si el crecimiento á sido satisfactorio o el tipo de caldo utilizado en el ensayo.
  - Resultado de pruebas bioquímicas.
  - Datos cuantitativos y cualitativos. Tales como conteos de mohos, levaduras y bacterias por el método vertido en placa (UFC); y resultados de las combinaciones de tubos (NMP) los positivos y los negativos.
  - Características morfológicas macroscópicas coloniales.
  - Cálculos.
  - Ausencia o presencia de un determinado microorganismo dependiendo de los resultados obtenidos.

## Detección de *Listeria monocytogenes*

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR	
	SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA	
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>		
<b>Identificación de la muestra</b>		
Crecimiento en caldo <i>listeria</i> : Satisfactorio <input type="checkbox"/> No satisfactorio <input type="checkbox"/>		
Descripción de las colonias en Palcam y/o Oxford:		
Pruebas Bioquímicas: Catalasa: positiva <input type="checkbox"/> negativa <input type="checkbox"/> La tinción: Gram positiva <input type="checkbox"/> Gram negativa <input type="checkbox"/> Hemolisis: positiva <input type="checkbox"/> negativa <input type="checkbox"/> Motilidad: positiva <input type="checkbox"/> negativa <input type="checkbox"/> Prueba de Carbohidratos: cumple <input type="checkbox"/> no cumple <input type="checkbox"/> especificaciones Prueba CAMP: cumple <input type="checkbox"/> no cumple <input type="checkbox"/> especificaciones		Resultado: <b><i>Listeria monocytogenes</i></b> Presente <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/>

### Llenado correcto del formulario de calidad

El crecimiento en el caldo *listeria* se considera satisfactorio cuando este presenta turbidez.

La descripción de las colonias comprende a las características morfológicas macroscópicas de las colonias aisladas obtenidas de la muestra, de las cuales, únicamente las que sean características se usaran para pruebas bioquímicas.

En la parte de pruebas bioquímicas comprende una lista de chequeo la cual se colocara la respuesta en las casillas indicando el resultado obtenido.

El resultado final se emite dependiendo de los resultados de las diferentes pruebas realizadas, el cual: *Listeria monocytogenes* está ausente o presente.

## Enumeración de Mohos y Levaduras

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR								
	SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA								
Enumeración de Mohos y Levaduras									
<b>Identificación de la muestra</b>									
Conteo de mohos (CM)				Conteo de levaduras (CL)				Identificación, características morfológicas macro y microscópicas:	
10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	Promedio:	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	Promedio:		
Resultado: CM: _____		CL: _____			CML: _____				

CML: conteo de mohos y levaduras, este se obtiene al sumar ambos promedios.

### Llenado correcto del formulario de calidad

En cada una de las casillas debajo de cada área de conteo, se colocan las cantidades ya sea de moho y/o levaduras encontradas en la muestra, luego de sacar el promedio de las cajas leídas en las diluciones inoculadas, se reporta el resultado, el cual puede ser parcial, para un solo parámetro: conteo de mohos y conteo de levaduras por separado y también se puede reportar un resultado total haciendo la suma de ambos lo cual se anota en la casilla de conteo de mohos y levaduras (CML)

Para el resultado final es importante multiplicar por el factor de dilución de la muestra.

## Determinación de *Escherichia coli* y bacterias Coliformes

		UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b> Determinación de <i>Escherichia coli</i> y bacterias Coliformes											
		Identificación de la muestra											
	Caldo Lauril sulfato			BGLB			EC			EC/MUG Fluorescencia			RESULTADO
Dil.	10	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	CT
24 H													CF
48 H													EC
Expresado por: UFC/g <input type="text"/> UFC/ml <input type="text"/>													

### Llenado correcto del formulario de calidad

En la casilla de lauril, se coloca cada una de las lecturas obtenidas a sus respectivas horas, ya sea a las 24 o a las 48 horas.

Las casillas de BGLB, sirve para anotar las respuestas de los coliformes totales a las respectivas horas, ya sea a las 24 o a las 48 horas.

La casilla de EC es para anotar la respuesta de los coliformes fecales pero si vamos a determinar *Escherichia coli* además de usar la casilla de respuesta de EC, los datos de la *Escherichia coli* luego de exponer los tubos positivos de EC a la lámpara ultra violeta se anotan en la casilla de EC/Mug fluorescencia

El resultado colocado va a depender de la combinación de los tubos, dados por la tabla de número más probable. Ver tabla N° 1.

El expresado por, depende de la naturaleza del alimento: solido NMP/g y si es liquido NMP/ml.

## Enumeración de *Escherichia coli*, bacterias Coliformes y Enterobacterias

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>											
	Enumeración de <i>Escherichia coli</i> , bacterias Coliformes y Enterobacterias											
<b>Identificación de la muestra</b>												
Conteo Coliformes totales (CT)				Conteo de <i>Escherichia coli</i> (EC)				Conteo de Enterobacterias (EN)				
10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	Resultado:	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	Resultado:	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	Resultado:	
Expresado por: UFC/g <input type="text"/> UFC/ml <input type="text"/>												

### Llenado correcto del formulario de calidad

En cada una de las casillas debajo de cada área de conteo, se colocan las cantidades ya sea de coliformes totales, *Escherichia coli* y/o de Enterobacterias, luego de sacar el promedio de las cajas leídas en las diluciones inoculadas, se reporta el resultado dependiendo de la naturaleza del alimento: si es sólido UFC/g y si es líquido UFC/ml.

## Determinación *Escherichia coli* O157:H7

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	
	Determinación <i>Escherichia coli</i> O157:H7	
<b>Identificación de la muestra</b>		
Morfología macroscópica colonial:	Resultado:	
X- GAL    positivo <input type="checkbox"/> negativo <input type="checkbox"/> EC MUG    positivo <input type="checkbox"/> negativo <input type="checkbox"/> INDOL    positivo <input type="checkbox"/> negativo <input type="checkbox"/> Prueba de Latex    O157 (+) (-) ; H7 (+) (-)	<b><i>Escherichia coli</i></b> O157:H7  Presente <input type="checkbox"/>  Ausente <input type="checkbox"/>	

### Llenado correcto del formulario de calidad

La morfología macroscópica colonial es la que nos va a presentar la bacteria en cualquier medio en el que inoculemos.

Si hay colonias con las características propias y posiblemente sospechosas, se realizan las demás pruebas, las cuales consisten en una lista de chequeo de resultados obtenidos.

El resultado obtenido luego de hacer la siembra y las pruebas, sería de ***Escherichia coli*** O157:H7 presente o ausente.

## Determinación de *Salmonella spp*

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR	
	SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA	
Determinación de <i>Salmonella spp</i>		
Identificación de la muestra		
Medio de pre-enriquecimiento:	Características coloniales	
	XLD	
	BS	
Tetrionato <input type="checkbox"/>	HE	
Rapaport <input type="checkbox"/>		
Selenito <input type="checkbox"/>		
TSI	<b><i>Salmonella spp</i></b> Presente <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/>	
LIA		
Movilidad: Positiva <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/>		
Urea: Positiva <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/>		
Poly H: Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>		

### Llenado correcto del formulario de calidad

En la parte de medio de enriquecimiento se coloca el medio utilizado en el análisis. Se chequea el caldo utilizado: tetrionato, rapaport o selenito.

Las características macroscópicas coloniales corresponden a cada uno de los medios sólidos en los que se ha sembrado, de los cuales si se presentan colonias características se procede a realizar pruebas bioquímicas.

En las casillas de pruebas bioquímicas se anota el resultado en TSI y en LIA y luego se chequean los resultados obtenidos en las diferentes pruebas.

Dependiendo de los resultados obtenidos en las pruebas realizadas se determina si *Salmonella spp* está ausente o presente.

## Enumeración de *Staphylococcus aureus*

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR					
	SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA					
Enumeración de <i>Staphylococcus aureus</i>						
Identificación de la muestra						
Características coloniales BPA:	Dilución	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	Coágulo	Catalasa Positiva <input type="checkbox"/>	Resultado:  UFC/g o ml
	Cant.				Catalasa Negativa <input type="checkbox"/>	
	0.3			Gram Positiva <input type="checkbox"/>		
	0.3			Gram Negativa <input type="checkbox"/>		
	0.4					
Promedio						

### Llenado correcto del formulario de calidad

Se anotan las características macroscópicas coloniales en el Baird Parker y de ser características de *Staphylococcus aureus* se anotan en la casilla dependiendo la cantidad de muestra inoculada en la placa y la dilución sembrada.

A las colonias presuntivas se les hacen pruebas bioquímicas de catalasa y coagulasa y se chequea la respuesta obtenida.

El resultado final se coloca dependiendo de la cantidad de microorganismo encontrado tomando en cuenta la dilución a la que se sembró, si no se obtuvo crecimiento o si las bacterias encontradas no cumplen con las características propias de *Staphylococcus aureus* en resultado se expresa menor de 10 UFC/g si se trata de sólido o menor de 10 UFC/ml si se trata de un líquido.

## Conteo total de bacterias aeróbicas en alimentos y bebidas

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR							
	SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA							
Conteo total de bacterias aeróbicas en alimentos y bebidas								
Identificación de la muestra								
Dilución	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	Cálculos:  Resultado:  UFC/g      UFC/mL
Placa 1								
Placa 2								
Promedio								

### Llenado correcto del formulario de calidad

En las casillas se coloca el resultado obtenido en las placas sembradas a las diferentes diluciones inoculadas.

El resultado final se reporta luego de sacar el promedio de las cajas leídas en las diluciones inoculadas, de no encontrar bacterias en la dilución más baja se reporta como menor que 10, se chequea el resultado dependiendo de la naturaleza del alimento: si es sólido UFC/g y si es líquido UFC/ml.

## Enumeración de *Bacillus cereus*

		UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR			
		<b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>			
		Enumeración de <i>Bacillus cereus</i>			
<b>Identificación de la muestra</b>					
<b>Dilución</b>	<b>10<sup>-2</sup></b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	Características macroscópicas coloniales: _____ _____ Tinción de gram: _____ Movilidad: Positiva <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/>	<b>Cálculos:</b>  <b>Resultado:</b> <b>UFC/g      UFC/mL</b>
<b>Placa 1</b>					
<b>Placa 2</b>					
<b>Promedio</b>					

### Llenado correcto del formulario de calidad

En las casillas se coloca el resultado obtenido en las placas sembradas a las diferentes diluciones inoculadas.

De encontrar colonias, se anotan las características macroscópicas coloniales y se realiza la tinción de gram y la prueba de movilidad para determinar si lo aislado es *Bacillus cereus* o no.

El resultado final se reporta luego de sacar el promedio de las cajas leídas y confirmadas como *Bacillus cereus* en las diluciones inoculadas, de no encontrar bacterias en la dilución más baja se reporta como menor que 100, se chequea el resultado dependiendo de la naturaleza del alimento: si es sólido UFC/g y si es líquido UFC/ml.

## Enumeración de *Clostridium perfringens*

		UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR			SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA	
		Enumeración de <i>Clostridium perfringens</i>				
Identificación de la muestra						
Dilución	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	Características macroscópicas coloniales: _____	<b>Cálculos:</b>  <b>Resultado:</b> <b>UFC/g      UFC/mL</b>	
Placa 1				Prueba de hierro-leche: _____		
Placa 2				Movilidad: Positiva <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/> Lactosa-gelatina: _____		
Promedio				Producción de nitrito: _____		

### Llenado correcto del formulario de calidad

En las casillas se coloca el resultado obtenido en las placas sembradas a las diferentes diluciones inoculadas.

De encontrar colonias, se anotan las características macroscópicas coloniales y se realiza la prueba de hierro-leche, movilidad y la producción de nitrito, para determinar si lo aislado es *Clostridium perfringens* o no.

El resultado final se reporta luego de sacar el promedio de las cajas leídas y confirmadas como *Clostridium perfringens* en las diluciones inoculadas, de no encontrar bacterias en la dilución más baja se reporta como menor que 10, se chequea el resultado dependiendo de la naturaleza del alimento: si es sólido UFC/g y si es líquido UFC/ml.

## Determinación de *Enterobacter sakazakii*

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b> Determinación de <i>Enterobacter sakazakii</i>	
	<b>Identificación de la muestra</b>	
Características macroscópicas coloniales: _____ Oxidasa: : Positiva <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/> Preparación al fresco: Tinción de gram: Api 20 E		Resultado: <b><i>Enterobacter sakazakii</i></b> Presencia <input type="checkbox"/> Ausencia <input type="checkbox"/>

### Llenado correcto del formulario de calidad

Si se aísla algún tipo de bacteria, de esta se anotan todas las características macroscópicas coloniales, de ser presuntivas, se procede a la realización de las pruebas bioquímicas: oxidasa, preparación de fresco, tinción de gram y API 20E

El resultado final se reporta dependiendo de los resultados obtenidos en las pruebas realizadas como *Enterobacter sakazakii* ausente o presente.

## Determinación de *Vibrio cholerae* 01

	UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR <b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>	
	Determinación de <i>Vibrio cholerae</i> 01	
<b>Identificación de la muestra</b>		
Características macroscópicas coloniales: _____ _____		Resultado:  <b><i>Vibrio cholerae</i> 01</b>  Presencia <input type="checkbox"/>  Ausencia <input type="checkbox"/>
AGS: Crecimiento con NaCl <input type="checkbox"/> Crecimiento sin NaCl <input type="checkbox"/>		
Formación de un hilo de hasta 3 cm <input type="checkbox"/>		
Oxidasa:      Positiva <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/>		
Aglutinación:      Positiva <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/>		

### Llenado correcto del formulario de calidad

Si se aísla algún tipo de bacteria, de esta se anotan todas las características macroscópicas coloniales, de ser presuntivas, se procede a la realización de las pruebas bioquímicas: AGS, crecimiento con NaCl y sin NaCl, formación de hilo, oxidasa, aglutinación.

El resultado final se reporta dependiendo de los resultados obtenidos en las pruebas realizadas como *Vibrio cholerae* 01 ausente o presente.

## Determinación de *Vibrio parahaemolyticus*

					UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR				
					<b>SECCION DE MICROBIOLOGIA APLICADA</b>				
					Determinación de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>				
<b>Identificación de la muestra</b>									
Dilución	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	AGS:				
APW					Oxidasa: Positiva <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/>				
TCBS					Tinción de gram:				
Lectura					Movilidad: Positiva <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/>				
Resultado:					Urea: Positiva <input type="checkbox"/> Negativa <input type="checkbox"/>				
NMP/g ó NMP/ml					API 20 NE:				

### Llenado correcto del formulario de calidad

En la casilla de APW se anotan los resultados obtenidos.

Las colonias en TCBS presentes se confirman por pruebas bioquímicas

En la casilla de TCBS se anotan los resultados positivos con colonias características obtenidas en la serie de tubos positivos dados.

La lectura se realiza de acuerdo a la combinación dada por la tabla de número más probable. Ver tabla N° 1.

**V. RESULTADOS Y DISCUSION DE  
RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Cuando se evalúa el riesgo microbiológico asociado a un alimento específico todos los microorganismos transmisibles a través de los alimentos deben ser considerados incluyendo bacterias, virus, hongos, levaduras, algas y parásitos.

Los riesgos asociados como las toxinas/metabolitos producidos por estos organismos y algunas propiedades intrínsecas (por ejemplo la resistencia a antibióticos) deben también ser considerados en la evaluación.

La presencia de algunos microorganismos en los alimentos no es necesariamente un índice de riesgo para el consumidor. Vegetales y animales son la principal fuente de los alimentos que se encuentran naturalmente asociados a microorganismos, lo que implica que los alimentos que de ellos se obtengan también estarán asociados naturalmente a microorganismos.

Los microorganismos elegidos para la elaboración de los criterios microbiológicos deben ser relevantes para el alimento y circunstancias particulares (producto crudo o listo para consumir, perfil del consumidor del producto). Si el criterio establece la búsqueda de microorganismos indicadores, su propósito debe ser detallado claramente (por ejemplo, detectar higiene inadecuada, indicar posible presencia de patógenos).

Es importante tener presente que, mientras para un alimento cocido o listo para consumir la tolerancia para un determinado microorganismo es cero, sí se puede permitir la presencia del mismo en el alimento crudo dentro de ciertos niveles si éste fuera sometido a un tratamiento previo a su consumo por el cual se eliminará dicho microorganismo (por ejemplo, cocción). En este mismo

sentido, la interpretación del resultado es diferente según se trate de producto crudo o producto cocido o listo para consumir.

El número de criterios utilizados a la hora de juzgar la calidad microbiológica de los alimentos debe limitarse al mínimo necesario para así poder aumentar el número de análisis.

Los criterios de análisis aplicados deben de ser específicos para cada alimento porque son diferentes los microorganismos patógenos que alteran a cada tipo de alimento.

El factor más importante en el análisis es el muestreo, ya que existe una heterogeneidad de la presencia de microorganismos en los alimentos. El muestreo incluye:

- Evaluación de la muestra necesaria para evitar la distorsión producida por los microorganismos que se encuentran en diferentes partes de las superficies, por ejemplo de las canales o de las máquinas, sistemas de alimentos heterogéneos (ensaladas, platos congelados, etc.).
- Determinación del modo óptimo de remoción del microorganismo de la muestra o lugar de muestreo.
- Evitar la contaminación ambiental durante la toma o transporte de muestras.

Los tratamientos tecnológicos pueden producir daños sub-letales en los microorganismos que no pueden, en esas condiciones, ser sometidos rigurosamente a medios selectivos. Son necesarios medios de recuperación en los que hay que considerar: (a) El tipo de microorganismo a recuperar (G+, G-, hongo), (b) El carácter y la intensidad del daño causado, (c) El tipo de alimento

en el que esté el microorganismo y (d) El medio selectivo final. Una vez considerado esto puede decidirse el tratamiento a seguir. De una forma general, hay dos tipos de tratamiento de recuperación: recuperación en líquido o en sólido, seguido del tratamiento selectivo (siembra en medio selectivo o recubrimiento con agar blando selectivo).

Las técnicas de análisis microbiológico de alimentos, referenciadas en las metodologías normalizadas de la administración de drogas y alimentos (FDA), presentan variaciones dependiendo de los diferentes grupos alimenticios o tipo de alimento por analizar.

La importancia del Manual es que sirve como herramienta para facilitar el desarrollo de las actividades de análisis, ya que presenta de forma sintética y sistemática las metodologías analíticas aplicables a los diferentes grupos de alimentos, las cuales sirven como guía para orientar al analista a la hora de realizar los análisis microbiológicos de alimentos, para garantizar la calidad e integridad de los resultados, así como la confiabilidad asociada.

Este manual se elaboro con el fin de mejorar las condiciones de trabajo, que sea de fácil entendimiento para las personas que laboran en estas áreas y brinde un servicio óptimo a quienes lo requieren.

## **VI. CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

1. El manual propuesto es una herramienta útil debido a que recopila técnicas microbiológicas para los diferentes grupos de alimentos, el cual contiene la adecuada descripción del procedimiento operacional para la realización del control de calidad microbiológico.
2. El manual tiene como propósito fundamental, facilitar el desarrollo de los análisis microbiológicos de los diferentes grupos de alimentos, proporcionando metodologías analíticas por microorganismos específicas para alimentos, lo que permite proporcionar resultados seguros y confiables.
3. Los procedimientos operacionales estándares describen en forma detallada las actividades realizadas en el laboratorio con el fin de proveer uniformidad, consistencia y confianza en cada una de las actividades que dentro de él se realizan.
4. Los métodos estándares presentados son muy importantes a la hora de la realización de los análisis de control de calidad microbiológico, ya que son procedimientos oficiales que han sido validados.
5. Los métodos de análisis deben de ser apropiados y deben ser reproducibles con resultados confiables ya que cada ensayo debe incorporar las características importantes como: Exactitud, Precisión, Sensibilidad, Reproducibilidad, Especificidad y Robustez.
6. Toda metodología analítica debe de validarse para su uso ya que por medio de este estudio el laboratorio establece que las características

representativas del método analítico cumplen con las especificaciones para su uso y asegura que los resultados obtenidos sean confiables.

7. Todo laboratorio de control de calidad microbiológico de alimentos, debe contar con un manual en el que se encuentren tanto las técnicas normalizadas de los análisis microbiológicos a realizar, así como los formularios de calidad para cada metodología.
8. Los formularios de calidad son documentos únicos que sirven para poder llevar un registro completo de los resultados obtenidos de dichos análisis, de esta manera toda la información se encuentra de una forma completa y ordenada, ya que se cuenta con una trazabilidad de la muestra, desde el inicio del análisis hasta que el mismo concluye.

## **VII. RECOMENDACIONES**

## 7. RECOMENDACIONES

1. Al Ministerio de Salud MINSAL, apliquen los protocolos de inspección de los hábitos de manipulación de alimentos, de forma que exista un mejor control de la inocuidad de los alimentos comercializados en el país.
2. A la alta gerencia de los laboratorios de control de calidad microbiológico, que faciliten el acceso y disponibilidad de los procedimientos técnicos por medio de manuales de métodos individualizados de forma clara y precisa, de tal forma que un analista pueda aplicar el procedimiento.
3. A los analistas de control de calidad microbiológico del área de alimentos Tomar en cuenta los planes de muestreo para que el número de unidades que comprenda una muestra de un lote de alimento determinado, sea estadísticamente representativo, para que los análisis sean confiables y proporcionen datos verídicos sobre la calidad microbiológica de todo el lote del alimento.
4. Al Organismo Salvadoreño de Reglamentación Técnica OSARTEC realizar una revisión periódica del Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 en materia relativa a los criterios microbiológicos para las diferentes matrices alimentarias, para de esta manera poder armonizar las metodologías del BAM con respecto a los parámetros ya establecidos y de igual forma incluir otras determinaciones tales como la identificación y detección de parásitos.
5. A los estudiantes de la Facultad de Química y Farmacia, que realicen investigaciones donde incluyan el análisis microbiológico de las diferentes matrices alimentarias.

6. A las instituciones que apliquen este manual, que validen las metodologías analíticas propuestas antes de su aplicación, con el objetivo de obtener resultados precisos y confiables.
7. A las instituciones que pongan en práctica el uso de este manual, que deben actualizar periódicamente de acuerdo a la dinámica de evolución de los conocimientos científicos y de los procesos tecnológicos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

1. American Public Health Association (APHA), Standard Methods for the examination o Dairy Products. (17 ed.). 800 I street, NW Washington, DC 20001-3710, 2004. [Consultado el 23 de abril de 2010]. Disponible en: [www.apha.org](http://www.apha.org)
2. Consejo de Ministros de Integración Económica Centroamericana (COMIECO). Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08. Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. 2009. [Consultado el 15 de junio de 2009]; 17-16. Disponible en: [http://www.protecnet.go.cr/centro\\_informacion/notificaciones%20kathia/RTCA%20%20Criterios%20Microbiologicos%20para%20la%20Inocuidad%20de%20los%20Alimentos.html](http://www.protecnet.go.cr/centro_informacion/notificaciones%20kathia/RTCA%20%20Criterios%20Microbiologicos%20para%20la%20Inocuidad%20de%20los%20Alimentos.html)
3. Food and Agriculture Organization (FAO). Manuales para el control de calidad de los alimentos: análisis microbiológico. Roma, 1981. [Consultado el 11 abril de 2009]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/009/ag173e/AG173E02.htm>
4. Food and Agriculture Organization (FAO). Queso madurado. [Consultado el 27 de septiembre de 2010]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/w2198s/W2198S08.htm>.Queso
5. Food and Drug Administration (FDA). Bacteriological Analytical Manual (BAM), 1998. (8 ed.). E.E.U.U. [Consultado el 2 de mayo de 2009]. Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>

6. Organización Mundial de la Salud (OMS). Inocuidad de los alimentos. [Consultado el 18 abril de 2010]. Disponible en: [http://www.who.int/topics/food\\_safety/es/](http://www.who.int/topics/food_safety/es/)
7. Organización Mundial de la Salud y Organización Panamericana de la Salud (OMS/OPS). Alimentos inocuos: prevenir enfermedades puede ser una tarea fácil. [Consultado el 18 abril de 2010]. Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/DPI/100/100feature41.htm>
8. Damien A. Gabis. Compendium for the microbiological examination of foods. Food for health. 2008; (3<sup>rd</sup> ed.). E.E.U.U. [Consultado el 3 de junio de 2009]. Disponible en: <http://healthyfoodinfo.blogspot.com/>
9. Hernández A., Hernández E., Hinds F. Propuesta de un manual de procedimientos normalizados de análisis microbiológico de alimentos para un laboratorio de microbiología [Trabajo de Graduación de Lic. en Química y Farmacia]. El Salvador, Universidad de El Salvador (UES); 2005. 252-269.
10. Concha F, Heredia N, Tejeda F, Zúñiga A. Microbiología Sanitaria. Revista Latinoamericana de Microbiología [Revista on-line]. 2006. [Consultado el 15 de marzo de 2009]; 48 (2): 226 – 230. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/esp/panole-htmse-microem-ei.htm>
11. [http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/notas\\_de\\_microbiologia\\_de\\_los\\_al.htm](http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/notas_de_microbiologia_de_los_al.htm). Microbiología de los alimentos (on-line). [Consultado el 10 abril de 2009]. Disponible en: [http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/notas\\_de\\_microbiologia\\_de\\_los\\_al.htm](http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/notas_de_microbiologia_de_los_al.htm)

12. [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/03/revistas/r\\_12/12\\_09\\_peligros.htm](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/03/revistas/r_12/12_09_peligros.htm). Inocuidad de alimentos (on-line). [Consultado el 10 abril de 2009]. Disponible en: [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r\\_12/1209\\_peligros.htm](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_12/1209_peligros.htm).
13. [http://www.fsis.usda.gov/En\\_espanol/Preparacion\\_de\\_Alimentos\\_Inocuos/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/En_espanol/Preparacion_de_Alimentos_Inocuos/index.asp). Manejo adecuado de los alimentos (on-line). [Consultado el 10 abril de 2009]. Disponible en: [http://www.fsis.usda.gov/En\\_espanol/Preparacion\\_de\\_Alimentos\\_Inocuos/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/En_espanol/Preparacion_de_Alimentos_Inocuos/index.asp).
14. [http://oswaldoparra.wordpress.com/2007/06/01/seguridad-alimentaria/Seguridad alimentaria](http://oswaldoparra.wordpress.com/2007/06/01/seguridad-alimentaria/Seguridad%20alimentaria/) (on-line). [Consultado el 10 abril de 2009]. Disponible en: <http://oswaldoparra.wordpress.com/2007/06/01/seguridad-alimentaria/>
15. <http://www.scscertified.com/foodag/foodsafety/index7ae9.html>. Food and agriculture services (on-line). [Consultado el 10 abril de 2009]. Disponible en: <http://www.scscertified.com/foodag/foodsafety/index7ae9.html>.
16. <http://www.uci.ac.cr/noticias/noticias38.asp>. Desarrollo humano, inocuidad y seguridad alimentaria (on-line). [Consultado el 3 abril de 2009]. Disponible en: <http://www.uci.ac.cr/noticias/noticias38.asp>
17. <http://www.monografias.com/trabajos41/inocuidad-alimentos/inocuidad-alimentos.shtml>. Inocuidad de los alimentos (on-line). [Consultado el 23 mayo de 2009]. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos41/inocuidad-alimentos/inocuidad-alimentos.shtml>.

18. [http://www.bvsde.paho.org/cd-dwq/docs\\_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Enterobacter%20sakazakii.pdf](http://www.bvsde.paho.org/cd-dwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Enterobacter%20sakazakii.pdf). Enterobacter sakazakii (on-line). [Consultado el 18 de marzo 2011]. Disponible en: [http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs\\_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Enterobacter%20sakazakii.pdf](http://www.bvsde.paho.org/cd-gdwq/docs_microbiologicos/Bacterias%20PDF/Enterobacter%20sakazakii.pdf).
19. <http://es.wikipedia.org/wiki/Aceite>. Aceites (on-line). ). [Consultado el 14 de mayo de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Aceite>.
20. [http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:aEfkARqNUTMJ:190.25.230.149:8080/dspace/bitstream/123456789/467/1/agua%2520envasada.pdf+definicion+de+agua+envasada&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEEsGfenw1NQUUemdDcEfDp85XjfNlzn\\_s389huDB9P12IAGszH9pIWBjsG7kd7VjcbDuaDwnYLO5C67LQ0KUEQ0GOWozu2aMD2sXZijDAW-OcymzXUZ7gcTr317IPrGJ5Gir569&sig=AHIEtbRog\\_BLBvbqglyHT4sKoJ5jgusjFw](http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:aEfkARqNUTMJ:190.25.230.149:8080/dspace/bitstream/123456789/467/1/agua%2520envasada.pdf+definicion+de+agua+envasada&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEEsGfenw1NQUUemdDcEfDp85XjfNlzn_s389huDB9P12IAGszH9pIWBjsG7kd7VjcbDuaDwnYLO5C67LQ0KUEQ0GOWozu2aMD2sXZijDAW-OcymzXUZ7gcTr317IPrGJ5Gir569&sig=AHIEtbRog_BLBvbqglyHT4sKoJ5jgusjFw). Agua envasada (on-line). [Consultado el 18 de abril de 2010].
21. [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:\\_ijiHbkaD\\_UJ:www.elergonomista.com/enfermeria/pediat1322.html+alimentos+complementarios+definicion&cd=7&hl=es&ct=clnk&source=www.google.com](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:_ijiHbkaD_UJ:www.elergonomista.com/enfermeria/pediat1322.html+alimentos+complementarios+definicion&cd=7&hl=es&ct=clnk&source=www.google.com). Alimentos complementarios (on-line).[Consultado el 23 de marzo de 2010].
22. [http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:ZWAINcZBZtsJ:datcp.wi.gov/uploads/Food/pdf/Spanish/DateMarking4\\_2.pdf+alimentos+listos+para+consumir&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEEsGMrbdyttb0htm2NnWsRSUyzIJZfwaaDau70PLEkSPfGWXfxTHvmZwNz4bGPVQk8kFOQEPV\\_idSSKANKm1EVOdeW\\_Rkm9wjJmEbnI\\_UztOyzNZwp6R1RB\\_8ZkGnLxIYpuT6OV0](http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:ZWAINcZBZtsJ:datcp.wi.gov/uploads/Food/pdf/Spanish/DateMarking4_2.pdf+alimentos+listos+para+consumir&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEEsGMrbdyttb0htm2NnWsRSUyzIJZfwaaDau70PLEkSPfGWXfxTHvmZwNz4bGPVQk8kFOQEPV_idSSKANKm1EVOdeW_Rkm9wjJmEbnI_UztOyzNZwp6R1RB_8ZkGnLxIYpuT6OV0)

E&sig=AHIEtbSziUfzZjAn1mX14yhGIXB1sgMWcg. Alimentos listos para consumir (on-line).[Consultado el 17 de marzo de 2010].

23. <http://es.wikipedia.org/wiki/Bebida>. Bebida (on-line).[Consultado el 2 de enero de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Bebida>

24. [http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:Kh6rmNuTZ8J:www.minsa.gob.ni/regulacion/alimentos/NTON%2520Generales/Norma%2520de%2520Refrescos%2520no%2520Carbonatados.doc+definicion+bebida+envasadas+no+carbonatadas&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEEShFwINEQNmoHYPPFlcMYZego2dQog\\_B2XLgdaSweJ3\\_Do5i7IEAyqiEoChGb3Zi2YLn1Nq\\_3x-l6H5JezF98DYkW6oz4fHVL5PCik2mPDSoc4KsbEqzirEA\\_31ZX\\_T\\_gOkjxDZ&sig=AHIEtbT9kdT9X7HqIz6SVhPuvuM9ldy1lg](http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:Kh6rmNuTZ8J:www.minsa.gob.ni/regulacion/alimentos/NTON%2520Generales/Norma%2520de%2520Refrescos%2520no%2520Carbonatados.doc+definicion+bebida+envasadas+no+carbonatadas&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEEShFwINEQNmoHYPPFlcMYZego2dQog_B2XLgdaSweJ3_Do5i7IEAyqiEoChGb3Zi2YLn1Nq_3x-l6H5JezF98DYkW6oz4fHVL5PCik2mPDSoc4KsbEqzirEA_31ZX_T_gOkjxDZ&sig=AHIEtbT9kdT9X7HqIz6SVhPuvuM9ldy1lg). Bebidas no carbonatadas (on-line). [Consultado el 5 de enero de 2010].

25. [http://es.wikipedia.org/wiki/Bocadillo\\_%28entrep%C3%A1n%29](http://es.wikipedia.org/wiki/Bocadillo_%28entrep%C3%A1n%29).Bocadillo (on-line). [Consultado el 14 de febrero de 2010]. Disponible en: [http://es.Wikipedia.org/wiki/Bocadillo\\_%28entrep%C3%A1n%29](http://es.Wikipedia.org/wiki/Bocadillo_%28entrep%C3%A1n%29)

26. <http://diccionario.babylon.com/cacao/>. Cacao (on-line). [Consultado el 14 de febrero de 2010]. Disponible en: <http://diccionario.babylon.com/cacao/>

27. <http://es.wikipedia.org/wiki/Caldo>. Caldo (on-line). [Consultado el 17 de febrero de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Caldo>.

28. <http://es.wikipedia.org/wiki/Carne>. Carne (on-line). [Consultado el 22 de febrero de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Carne>.

29. [http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:hqqJLyJnKN8J:www.redsalud.gov.cl/portal/url/item/6e97e38fc6718827e04001011f014080.pdf+que+es+carne+congelada&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEEShzW7Nz9PeOlyEpyZVAwASq5cJC0O4fHyclDjSpW6M7odY\\_yQdQQ6QSN8NSNizC5oP0F7jF\\_Tlb5T\\_qDSb-knyt07d9eD-rVltWIZLVMqw2gfLgHbL7DPKbyOsIZ5QDkcOfFFlu&sig=AHIEtbTsHd5\\_nbfEzglQf8-g7mJX\\_W1XDA](http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:hqqJLyJnKN8J:www.redsalud.gov.cl/portal/url/item/6e97e38fc6718827e04001011f014080.pdf+que+es+carne+congelada&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEEShzW7Nz9PeOlyEpyZVAwASq5cJC0O4fHyclDjSpW6M7odY_yQdQQ6QSN8NSNizC5oP0F7jF_Tlb5T_qDSb-knyt07d9eD-rVltWIZLVMqw2gfLgHbL7DPKbyOsIZ5QDkcOfFFlu&sig=AHIEtbTsHd5_nbfEzglQf8-g7mJX_W1XDA). Carne (on-line). [Consultado el 22 de febrero de 2010].
30. <http://es.wikipedia.org/wiki/Cereal>. Cereales (on-line). [Consultado el 11 de febrero de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Cereal>.
31. <http://es.wikipedia.org/wiki/Chocolate>. Chocolate (on-line). [Consultado el 17 de febrero de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Chocolate>.
32. [http://es.wikipedia.org/wiki/Clara\\_de\\_huevo](http://es.wikipedia.org/wiki/Clara_de_huevo). Clara de huevo (on-line). [Consultado el 9 de febrero de 2010]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Clara\\_de\\_huevo](http://es.wikipedia.org/wiki/Clara_de_huevo)
33. <http://es.wikipedia.org/wiki/Aderezo>. Condimento (on-line). [Consultado el 6 de febrero de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Aderezo>
34. <http://www.productoscarnicos.com/>. Productos carnicos (on-line). [Consultado el 6 de febrero de 2010]. Disponible en: <http://www.productoscarnicos.com/>.
35. [http://www.navarra.es/NR/rdonlyres/787C64EA-7088-4769-966C-366F2A70256A/0/012NTAConservasvegetales\\_V2\\_.pdf](http://www.navarra.es/NR/rdonlyres/787C64EA-7088-4769-966C-366F2A70256A/0/012NTAConservasvegetales_V2_.pdf). Conservas vegetales

(on-line). [Consultado el 7 de febrero de 2011]. Disponible en:[http://www.navarra.es/NR/rdonlyres/787C64EA-7088-4769-966C-366F2A70256A/0/012NTAConservasvegetales\\_V2\\_.pdf](http://www.navarra.es/NR/rdonlyres/787C64EA-7088-4769-966C-366F2A70256A/0/012NTAConservasvegetales_V2_.pdf).

36. <http://es.wikipedia.org/wiki/Consom%C3%A9>. Consomé (on-line). [Consultado el 9 de febrero de 2011]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Consom%C3%A9>

37. <http://www.google.com/search?q=definicion%20de%20jugos%20no%20pasteurizados&ie=utf-8&oe=utf-8&aq=t&rls=org.mozilla:es-ES:official&client=firefox-a&source=hp&channel=np#q=Cremas&bav=on.2,or.&fp=a3ef50dd719b246f&hl=es&rls=org.mozilla:es-ES:official&tbs=dfn:1>. Crema (on-line). [Consultado el 5 de febrero de 2010].

38. [http://www.google.com/#hl=es&q=Crema+acida&tbs=dfn:1&tbo=u&sa=X&ei=ehapTansOIm\\_gQe\\_n8XzBQ&ved=0CBUQkQ4&fp=bb79513b01213c8c](http://www.google.com/#hl=es&q=Crema+acida&tbs=dfn:1&tbo=u&sa=X&ei=ehapTansOIm_gQe_n8XzBQ&ved=0CBUQkQ4&fp=bb79513b01213c8c). Crema acida (on-line). [Consultado el 5 de febrero de 2010]. Disponible en: [http://www.google.com/#hl=es&q=Crema+acida&tbs=dfn:1&tbo=u&sa=X&ei=ehapTansOIm\\_gQe\\_n8XzBQ&ved=0CBUQkQ4&fp=bb79513b01213c8c](http://www.google.com/#hl=es&q=Crema+acida&tbs=dfn:1&tbo=u&sa=X&ei=ehapTansOIm_gQe_n8XzBQ&ved=0CBUQkQ4&fp=bb79513b01213c8c).

39. [http://es.wikipedia.org/wiki/Crema\\_batida](http://es.wikipedia.org/wiki/Crema_batida). Crema batida (on-line). [Consultado el 16 de febrero de 2010]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Crema\\_batida](http://es.wikipedia.org/wiki/Crema_batida)

40. <http://www.sice.oas.org/trade/mrcsrs/resolutions/Res7193.asp>. Crema UHT (on-line). [Consultado el 15 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://www.sice.oas.org/trade/mrcsrs/resolutions/Res7193.asp>

41. <http://es.wikipedia.org/wiki/Crust%C3%A1ceos>. Crustáceos (on-line). [Consultado el 15 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Crust%C3%A1ceos>
42. <http://www.respyn.uanl.mx/4/contexto/nom030.html>. Crustáceos en conserva (on-line). [Consultado el 17 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/4/contexto/nom030.html>.
43. <http://www.alimentacion-sana.com.ar/portal%20nuevo/actualizaciones/huevo.htm>. Huevo (on-line). [Consultado el 17 de mayo de 2011]. Disponible en: <http://www.alimentacion-sana.com.ar/portal%20nuevo/actualizaciones/huevo.htm>.
44. [http://es.wikipedia.org/wiki/Dulce\\_de\\_leche](http://es.wikipedia.org/wiki/Dulce_de_leche). Dulce de leche (on-line). [Consultado el 29 de mayo de 2011]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Dulce\\_de\\_leche](http://es.wikipedia.org/wiki/Dulce_de_leche).
45. [http://es.wikipedia.org/wiki/Edulcorante\\_artificial](http://es.wikipedia.org/wiki/Edulcorante_artificial). Edulcorante (on-line). [Consultado el 15 de abril de 2011]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Edulcorante\\_artificial](http://es.wikipedia.org/wiki/Edulcorante_artificial)
46. <http://es.wikipedia.org/wiki/Emulsi%C3%B3n>. Emulsion (on-line). [Consultado el 20 de abril de 2011]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Emulsi%C3%B3n>
47. <http://es.wikipedia.org/wiki/Equinodermos>. Equinodermos (on-line). [Consultado el 23 de abril de 2011]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Equinodermos>

48. <http://es.wikipedia.org/wiki/Especias>. Especia (on-line). [Consultado el 27 de abril de 2011]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Especias>
49. [http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:nHjzrwUFBWUJ:www.code-xalimentarius.net/download/standards/27/CXP\\_042s.pdf+definicion+de+hierbas+desecadas&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEEESi8iml3-r3tNcVSYUKvmvVtbgeFaXqRCTUwWWUS0S6nA46JqUnoy7Axx\\_aXYmBeWKTXSCKrPOwlGTypWV2noLXmI8INYVN8tFfVRiLRKfniUhY4-1AFCfVhbfGxQ1c5ZfJnQn6p&sig=AHIEtbTvWc8BE0vdJWAgsbiCRIfvtMpX1w](http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:nHjzrwUFBWUJ:www.code-xalimentarius.net/download/standards/27/CXP_042s.pdf+definicion+de+hierbas+desecadas&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEEESi8iml3-r3tNcVSYUKvmvVtbgeFaXqRCTUwWWUS0S6nA46JqUnoy7Axx_aXYmBeWKTXSCKrPOwlGTypWV2noLXmI8INYVN8tFfVRiLRKfniUhY4-1AFCfVhbfGxQ1c5ZfJnQn6p&sig=AHIEtbTvWc8BE0vdJWAgsbiCRIfvtMpX1w). Hierbas desecadas (on-line). [Consultado el 27 de abril de 2011].
50. <http://www.obesidad.net/spanish2002/default.htm>. Formulas lácteas (on-line). [Consultado el 27 de abril de 2011]. Disponible en: <http://www.obesidad.net/spanish2002/default.htm>.
51. <http://es.wikipedia.org/wiki/Fritura>. Fritura (on-line). [Consultado el 27 de abril de 2011]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Fritura>.
52. <http://enciclopedia.us.es/index.php/Fruta>. Frutas (on-line). [Consultado el 29 de abril de 2011]. Disponible en: <http://enciclopedia.us.es/index.php/Fruta>
53. <http://frutal-es.com/docs/centro/manualestandares.pdf>. Fruta congelada (on-line). [Consultado el 27 de abril de 2010]. Disponible en: <http://frutal-es.com/docs/centro/manualestandares.pdf>.

54. <http://www.escet.urjc.es/~isierra/Tema12.pdf>. Fruta deshidratada (on-line). [Consultado el 18 de diciembre de 2010]. Disponible en: <http://www.escet.urjc.es/~isierra/Tema12.pdf>.
55. <http://es.wikipedia.org/wiki/Fruta>. Fruta (on-line). [Consultado el 14 de diciembre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Fruta>.
56. [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/programa\\_calidad/Marco\\_Regulatorio/CONAL/Informes\\_grupos\\_de\\_trabajo/Alimentos\\_vegetales\\_Informe\\_IV\\_gama.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/programa_calidad/Marco_Regulatorio/CONAL/Informes_grupos_de_trabajo/Alimentos_vegetales_Informe_IV_gama.pdf). Alimentos vegetales (on-line). [Consultado el 14 de agosto de 2010]. Disponible en: [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/programa\\_calidad/Marco\\_Regulatorio/CONAL/Informes\\_grupos\\_de\\_trabajo/Alimentos\\_vegetales\\_Informe\\_IV\\_gama.pdf](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/programa_calidad/Marco_Regulatorio/CONAL/Informes_grupos_de_trabajo/Alimentos_vegetales_Informe_IV_gama.pdf).
57. <http://es.wikipedia.org/wiki/Galletas>. Galletas (on-line). [Consultado el 3 de agosto de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Galletas>.
58. <http://es.wikipedia.org/wiki/Grasa>. Grasa (on-line). [Consultado el 2 de agosto de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Grasa>.
59. <http://es.wikipedia.org/wiki/Helado>. Helado (on-line). [Consultado el 29 de agosto de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Helado>.
60. <http://www.astromia.com/glosario/hielo.htm>. Hielo (on-line). [Consultado el 29 de agosto de 2010]. Disponible en: <http://www.astromia.com/glosario/hielo.htm>.
61. <http://es.wikipedia.org/wiki/Hortaliza>. Hortaliza (on-line). [Consultado el 29 de agosto de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Hortaliza>.

62. [http://es.wikipedia.org/wiki/Huevo\\_%28alimento%29](http://es.wikipedia.org/wiki/Huevo_%28alimento%29). Huevos (on-line). [Consultado el 29 de agosto de 2010]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Huevo\\_%28alimento%29](http://es.wikipedia.org/wiki/Huevo_%28alimento%29).
63. [http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:0IWksTuDkL8J:www.maryper.com/FICHAS\\_TECNICAS/fichas\\_tecnicas\\_PDF/HUEVO%2520L%25CDQUIDO%2520PASTEURIZADO.pdf+huevos+pasteurizados&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEEShCn3-789VNEYk80XGFhs28nwpakPISCZVJ2KK\\_\\_5KC0BaScSXIG1gte4Yh\\_Ds44Ec5-IE9XTIQpJCdIT\\_f2DNbNC5sAqHFTM7LxjWDK52gXW8ecEAZ5VHJXYvAw1jgPkQmH7hJ&sig=AHÍEtbQM5ygRcruYY\\_H0mnY6vDkCiQ-Amw](http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:0IWksTuDkL8J:www.maryper.com/FICHAS_TECNICAS/fichas_tecnicas_PDF/HUEVO%2520L%25CDQUIDO%2520PASTEURIZADO.pdf+huevos+pasteurizados&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEEShCn3-789VNEYk80XGFhs28nwpakPISCZVJ2KK__5KC0BaScSXIG1gte4Yh_Ds44Ec5-IE9XTIQpJCdIT_f2DNbNC5sAqHFTM7LxjWDK52gXW8ecEAZ5VHJXYvAw1jgPkQmH7hJ&sig=AHÍEtbQM5ygRcruYY_H0mnY6vDkCiQ-Amw). Huevo pasteurizado (on-line).
64. [http://es.wikipedia.org/wiki/Mate\\_%28infusi%C3%B3n%29](http://es.wikipedia.org/wiki/Mate_%28infusi%C3%B3n%29). Infusión (on-line). [Consultado el 24 de agosto de 2010]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Mate\\_%28infusi%C3%B3n%29](http://es.wikipedia.org/wiki/Mate_%28infusi%C3%B3n%29)
65. <http://www.escet.urjc.es/~isierra/Tema12.pdf>. Jaleas (on-line). [Consultado el 17 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://www.escet.urjc.es/~isierra/Tema12.pdf>.
66. <http://es.wikipedia.org/wiki/Leche>. Leche (on-line). [Consultado el 14 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Leche>.
67. [http://es.wikipedia.org/wiki/Leche\\_condensada](http://es.wikipedia.org/wiki/Leche_condensada). Leche condensada (on-line). [Consultado el 12 de octubre de 2010]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Leche\\_condensada](http://es.wikipedia.org/wiki/Leche_condensada).

68. [http://es.wikipedia.org/wiki/Leche\\_en\\_polvo](http://es.wikipedia.org/wiki/Leche_en_polvo). Leche en polvo (on-line). [Consultado el 15 de octubre de 2010]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Leche\\_en\\_polvo](http://es.wikipedia.org/wiki/Leche_en_polvo)
69. [http://es.wikipedia.org/wiki/Leche\\_evaporada](http://es.wikipedia.org/wiki/Leche_evaporada). Leche evaporada (on-line). [Consultado el 3 de octubre de 2010]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Leche\\_evaporada](http://es.wikipedia.org/wiki/Leche_evaporada)
70. <http://html.rincondelvago.com/leches-pasteurizadas-esterilizadas-y-uht.html>. Leche UHT (on-line). [Consultado el 3 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://html.rincondelvago.com/leches-pasteurizadas-esterilizadas-y-uht.html>.
71. [http://es.wikipedia.org/wiki/Mantequilla\\_de\\_man%C3%AD](http://es.wikipedia.org/wiki/Mantequilla_de_man%C3%AD). Manteca de maní (on-line). [Consultado el 7 de octubre de 2010]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Mantequilla\\_de\\_man%C3%AD](http://es.wikipedia.org/wiki/Mantequilla_de_man%C3%AD)
72. <http://www.google.com/#sclient=psy&hl=es&tbs=dfn:1&source=hp&q=mantequilla&aq=f&aqi=g10&aql=&oq=&pbx=1&fp=54e58479962b45dd>. Mantequilla (on-line). [Consultado el 2 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://www.google.com/#sclient=psy&hl=es&tbs=dfn:1&source=hp&q=mantequilla&aq=f&aqi=g10&aql=&oq=&pbx=1&fp=54e58479962b45dd>.
73. <http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/Chef/grasas.htm>. Margarinas (on-line). [Consultado el 19 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/Chef/grasas.htm>.

74. <http://www.escet.urjc.es/~isierra/Tema12.pdf>. Mermeladas (on-line). [Consultado el 21 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://www.escet.urjc.es/~isierra/Tema12.pdf>.
75. <http://es.wikipedia.org/wiki/Mayonesa>. Mayonesa (on-line). [Consultado el 17 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Mayonesa>.
76. <http://es.wikipedia.org/wiki/Mazap%C3%A1n>. Mazapán (on-line). [Consultado el 22 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Mazap%C3%A1n>.
77. <http://es.wikipedia.org/wiki/Miel>. Miel (on-line). [Consultado el 22 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Miel>.
78. <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/x7603s/x7603s0p.htm>. Moluscos bivalvos vivos (on-line). [Consultado el 15 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/x7603s/x7603s0p.htm>.
79. <http://es.wikipedia.org/wiki/Mostaza>. Mostaza (on-line). [Consultado el 9 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Mostaza>
80. <http://www.chefuri.com/v4/tecnologia.php?id=141>. Muffins (on-line). [Consultado el 7 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://www.chefuri.com/v4/tecnologia.php?id=141>
81. <http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:YrDqM1Ua-2cJ:www.itdg.org.pe/fichastecnicas/pdf/FichaTecnica12.pdf+definicion+nectares&hl=es>

&pid=bl&srcid=ADGEEESgoXvh8ladLsWn0q2lq0OyhTe\_Sub1FxnYp8ne1-2b2-0fouSChCJvpKTWVXef5UQxTwICYb0M-3yiJAKxvW8Srh\_On7gAzy\_Oo\_\_K5XqE73CFycBjUDiV0B\_dW\_tia-Vy7wiPU&sig=AHIEtbQGJtX6YXyQUtj\_x7jocgy7s5XE-w. Néctar (on-line). [Consultado el 3 de octubre de 2010].

82. <http://drae2.es/nuez>. Nuez (on-line). [Consultado el 5 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://drae2.es/nuez>.

83. <http://es.wikipedia.org/wiki/Pan>. Pan (on-line). [Consultado el 5 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Pan>.

84. <http://es.wikipedia.org/wiki/Pasta>. Pasta (on-line). [Consultado el 12 de septiembre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Pasta>.

85. <http://es.wikipedia.org/wiki/Pastel>. Pastel (on-line). [Consultado el 12 de septiembre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Pastel>.

86. <http://es.wikipedia.org/wiki/Pescado>. Pescado (on-line). [Consultado el 16 de septiembre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Pescado>

87. <http://pescadosymariscos.consumer.es/metodos-de-conservacion/pescados-curados/>. Pescado (on-line). [Consultado el 9 de septiembre de 2010]. Disponible en: <http://pescadosymariscos.consumer.es/metodos-de-conservacion/pescados-curados/>.

88. <http://www.productoscarnicos.com/>. Productos cárnicos (on-line). [Consultado el 9 de septiembre de 2010]. Disponible en: <http://www.productoscarnicos.com/>.
89. <http://es.wikipedia.org/wiki/Postre>. Postre (on-line). [Consultado el 9 de septiembre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Postre>
90. <http://www.productoscarnicos.com/>. Productos cárnicos (on-line). [Consultado el 9 de septiembre de 2010]. Disponible en: <http://www.productoscarnicos.com/>.
91. [http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:PirDSx4SGncJ:suiser.com/db/asociarDocumentos/dbFiles/95.pdf+definicion+de+productos+concentrados&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEESiVnRk9xY5GEYInnUoI-97tD33VOOGdmsmzhvuWFyYJzuBeEnuAWKTHeAo0dhnBal3zRFHy3hRjhUc2w8cIIbBwpTw2pQS1OWaquNrBcnLdy\\_e47FVJgc1AstgL-vSAXU6CL-M&sig=AHIEtbR2-KTQo6NLQsO5FoYrLvNKForl4g](http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:PirDSx4SGncJ:suiser.com/db/asociarDocumentos/dbFiles/95.pdf+definicion+de+productos+concentrados&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEESiVnRk9xY5GEYInnUoI-97tD33VOOGdmsmzhvuWFyYJzuBeEnuAWKTHeAo0dhnBal3zRFHy3hRjhUc2w8cIIbBwpTw2pQS1OWaquNrBcnLdy_e47FVJgc1AstgL-vSAXU6CL-M&sig=AHIEtbR2-KTQo6NLQsO5FoYrLvNKForl4g). Producto concentrado (on-line). [Consultado el 20 de septiembre de 2010].
92. [http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:FpiTINp6rLQJ:www.alfa-editores.com/alimentaria/Marzo%2520-%2520Abril%252006/TECNOLOGIA%2520Confiteria.pdf+defincion+de+productos+de+confiteria&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEESiftGZEgno8g\\_Pls4r3Xy8zva2nPXOM9FvxZI9N81pcAU\\_Q8sVu5h7t5M2ziJe0oaXoy4iwKHOCeCfK0TPkKc6o9-q77aDvLruiiv1b ekNA0BIOz6PsT-uZBhXJue7TrXlo2e7Q&sig=AHIEtbQqkd7qvAg9lr6ianHEQbnsa4R0Zw](http://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:FpiTINp6rLQJ:www.alfa-editores.com/alimentaria/Marzo%2520-%2520Abril%252006/TECNOLOGIA%2520Confiteria.pdf+defincion+de+productos+de+confiteria&hl=es&pid=bl&srcid=ADGEESiftGZEgno8g_Pls4r3Xy8zva2nPXOM9FvxZI9N81pcAU_Q8sVu5h7t5M2ziJe0oaXoy4iwKHOCeCfK0TPkKc6o9-q77aDvLruiiv1b ekNA0BIOz6PsT-uZBhXJue7TrXlo2e7Q&sig=AHIEtbQqkd7qvAg9lr6ianHEQbnsa4R0Zw). Productos de confitería (on-line). [Consultado el 20 de septiembre de 2010].

93. <http://www.google.com/search?q=definicion%20de%20jugos%20no%20pasteurizados&ie=utf-8&oe=utf-8&aq=t&rls=org.mozilla:es-ES:official&client=firefox-a&source=hp&channel=np#q=Pupusas&bav=on.2,or.&fp=a3ef50dd719b246f&hl=es&rls=org.mozilla:es-ES:official&tbs=dfn:1>. Pupusa (on-line). [Consultado el 27 de septiembre de 2010].
94. [http://es.wikipedia.org/wiki/Queso\\_fresco](http://es.wikipedia.org/wiki/Queso_fresco). Queso fresco (on-line). [Consultado el 27 de septiembre de 2010]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Queso\\_fresco](http://es.wikipedia.org/wiki/Queso_fresco).
95. [http://es.wikipedia.org/wiki/Queso\\_procesado](http://es.wikipedia.org/wiki/Queso_procesado). Queso procesado (on-line). [Consultado el 30 de septiembre de 2010]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Queso\\_procesado](http://es.wikipedia.org/wiki/Queso_procesado).
96. <http://es.wikipedia.org/wiki/Queques>. Queques (on-line). [Consultado el 29 de septiembre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Queques>
97. <http://es.wikipedia.org/wiki/Reques%C3%B3n>. Requesón (on-line). [Consultado el 29 de septiembre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Reques%C3%B3n>
98. [http://es.wikipedia.org/wiki/Salsa\\_%28gastronom%C3%ADa%29](http://es.wikipedia.org/wiki/Salsa_%28gastronom%C3%ADa%29). Salsa (on-line). [Consultado el 2 de noviembre de 2010]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Salsa\\_%28gastronom%C3%ADa%29](http://es.wikipedia.org/wiki/Salsa_%28gastronom%C3%ADa%29)

99. [http://es.wikipedia.org/wiki/Salsa\\_de\\_tomate](http://es.wikipedia.org/wiki/Salsa_de_tomate). Salsa de tomate (on-line). [Consultado el 2 de noviembre de 2010]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Salsa\\_de\\_tomate](http://es.wikipedia.org/wiki/Salsa_de_tomate).
100. <http://es.wikipedia.org/wiki/Semilla>. Semilla (on-line). [Consultado el 5 de noviembre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Semilla>.
101. <http://es.wikipedia.org/wiki/Snacks>. Snacks (on-line). [Consultado el 5 de noviembre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Snacks>.
102. <http://www.google.com/search?q=definicion%20de%20jugos%20no%20pasteurizados&ie=utf-8&oe=utf-8&aq=t&rls=org.mozilla:es-ES:official&client=firefox-a&source=hp&channel=np#q=Sopas&bav=on.2,or.&fp=a3ef50dd719b246f&hl=es&rls=org.mozilla:es-ES:official&tbs=dfn:1>. Sopa (on-line). [Consultado el 7 de noviembre de 2010].
103. <http://es.wikipedia.org/wiki/Tamal>. Tamal (on-line). [Consultado el 9 de noviembre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Tamal>.
104. [http://es.wikipedia.org/wiki/Torta\\_%28M%C3%A9xico%29](http://es.wikipedia.org/wiki/Torta_%28M%C3%A9xico%29). Torta (on-line). [Consultado el 9 de noviembre de 2010]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Torta\\_%28M%C3%A9xico%29](http://es.wikipedia.org/wiki/Torta_%28M%C3%A9xico%29).
105. <http://www.google.com/search?q=definicion%20de%20jugos%20no%20pasteurizados&ie=utf-8&oe=utf-8&aq=t&rls=org.mozilla:es-ES:official&client=firefox-a&source=hp&channel=np#q=Tortillas&bav=on.2,or.&fp=a3ef50dd719b246f&hl=es&rls=org.mozilla:es-ES:official&tbs=dfn:1>. Tortilla (on-line). [Consultado el 11 de noviembre de 2010].

106. <http://es.wikipedia.org/wiki/Turr%C3%B3n>. Turrón (on-line). [Consultado el 15 de noviembre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Turr%C3%B3n>.
107. [http://es.wikipedia.org/wiki/Yema\\_de\\_huevo](http://es.wikipedia.org/wiki/Yema_de_huevo). Yema de huevo (on-line). [Consultado el 17 de noviembre de 2010]. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Yema\\_de\\_huevo](http://es.wikipedia.org/wiki/Yema_de_huevo).
108. <http://es.wikipedia.org/wiki/Yogur>. Yogur (on-line). [Consultado el 17 de noviembre de 2010]. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Yogur>.

## **GLOSARIO**

## GLOSARIO

**Aceite:** es un término genérico para designar numerosos líquidos grasos de orígenes diversos que no se disuelven en el agua y que tienen menor densidad que ésta. <sup>(19)</sup>

**Agua envasada:** agua purificada y empacada para consumo humano. <sup>(20)</sup>

**Alimentación complementaria:** es todo alimento no lácteo que ingiere el lactante durante el primer año de vida. Deben aportarse en pequeñas cantidades de forma individualizada, lenta y progresiva, de tal forma que al año de vida el niño debe tener una alimentación similar a la del resto de la familia, a excepción de algunos nutrientes. Con el inicio de la Alimentación Complementaria se debe cumplir al menos las necesidades nutricionales del niño, y de esta forma conseguir un crecimiento y desarrollo óptimo. <sup>(21)</sup>

**Alimentos listos para consumir:** son alimentos elaborados con huevos, carne, productos lácteos, etc. Que se preparan en establecimientos de venta al público para ser conservados en refrigeradores por más de 24 horas. <sup>(22)</sup>

**Bebida:** es cualquier líquido que se ingiere y aunque la bebida por excelencia es el agua, el término se refiere por antonomasia a las bebidas alcohólicas y las bebidas gaseosas. Las infusiones también son un ejemplo de uso masivo de bebidas. <sup>(23)</sup>

**Bebidas no carbonatadas:** es una bebida no alcohólica que no contiene dióxido de carbono (anhídrido carbónico) disuelto, elaborada a partir de agua potable, adicionado con azúcar y otros edulcorantes permitidos, saborizantes naturales o artificiales, colorantes naturales o artificiales y acidificantes, con o

sin la adición de sustancias preservantes, vitaminas y otros aditivos alimentarios permitidos y que han sido sometidos a un proceso tecnológico adecuado. (24)

**Bocadillo:** es un trozo de pan o un panecillo, un bollo en el que en su centro se ha colocado algún tipo de alimento o una combinación de ellos. Normalmente se suele abrir el pan longitudinalmente en dos mitades. (25)

**Cacao:** semilla del *Theobroma cacao*, un árbol tropical de la familia de las esterculiáceas. Del cacao se obtiene el chocolate y un aceite sólido a temperatura ambiente (mantequilla de cacao) que se utiliza para la elaboración de barras de labios y de supositorios. (26)

**Caldo:** es en gastronomía, en agua uno o varios ingredientes, por regla general carnes, pescados o vegetales.<sup>1</sup> Así se tiene que el caldo de pollo es simplemente agua en que se ha cocido, a veces en presencia de carne, pedazos de pollo (siendo posible los huesos), caldo de pescado es agua en que se ha cocido pescado (o sus espinas), caldo de res es agua en que se ha cocido carne bovina, y caldo de cerdo es agua en que se ha cocido carne de cerdo. La cocción se realiza en una olla de bordes altos. Este tipo de alimento se encuentra en la categoría de las salsas ya que su forma concentrada entra a menudo en su elaboración. Los caldos son la base de muchas preparaciones culinarias como las sopas, las cremas y los arroces. (27)

**Carne:** es el tejido animal, principalmente muscular, que se consume como alimento. Desde el punto de vista nutricional la carne es una fuente habitual de proteínas, grasas y minerales en la dieta humana. (28)

**Carne congelada:** es aquella cuya temperatura interna medida en el centro de la masa muscular es de -18 °C como máximo. (29)

**Carne fresca:** es aquella que ha sido sometida a un proceso de enfriamiento en un rango de temperatura de 1 a 7 °C por 24 a 48 horas. (28)

**Cereales:** son gramíneas, herbáceas cuyos granos o semillas están en la base de la alimentación humana o del ganado, generalmente molidos en forma de harina. (29)

**Chocolate:** es el alimento que se obtiene mezclando azúcar con dos productos derivados de la manipulación de las semillas del cacao: una materia sólida (*la pasta de cacao*) y una materia grasa (*la manteca de cacao*). A partir de esta combinación básica, se elaboran los distintos tipos de chocolate, que dependen de la proporción entre estos elementos y de su mezcla o no con otros productos tales como leche y frutos secos. (31)

**Clara de huevo:** es el nombre común que hace referencia al líquido semitransparente que contienen los huevos. Se caracteriza por su alto contenido en proteínas del huevo. Científicamente se le conoce con el nombre de albumen. (32)

**Condimento:** o aderezo es un ingrediente o mezcla añadida a la comida para darle un sabor especial o complementarla. A menudo fuertes de sabor y por tanto incluidos en pequeñas cantidades, son condimentos populares (en Occidente) la sal, la pimienta, el ketchup, la mostaza, la mahonesa, el aceite de oliva, el vinagre y el azúcar. (33)

**Conservas cárnicas:** son la carne o los productos cárnicos que se tratan adecuadamente con calor en envases cerrados, herméticos, que pueden ser latas, pomos, tripas artificiales o bolsas de materiales flexibles y que pueden ser almacenados por un largo tiempo. (34)

**Conservas vegetales:** los productos obtenidos esterilizando térmicamente las hortalizas y verduras enteras, troceadas o trituradas con o sin líquido de gobierno. (35)

**Consomé:** es un caldo concentrado elaborado con carnes o con pescado (fumet). Por regla general se sirve caliente al comienzo de la comida. (36)

**Crema:** es una familia de preparaciones con una consistencia cremosa, que más comúnmente se refiere a un postre o a una salsa de postre, pero también puede prepararse para ser usada en comidas saladas. Es elaborada a partir de leche y huevos, espesadas con calor. (37)

**Crema acida:** la crema agria es una crema de leche cultivada, con adición de sal y aditivos permitidos; de textura suave, aromática, sabor ácido, el cual la diferencia de la crema de leche (nata), además de la alta viscosidad. (38)

**Crema batida:** es una crema de leche, a menudo edulcorada, que ha sido batida para incorporarle aire. Si la nata tiene un 30% o más de grasa puede ser mezclada con aire, de modo que las burbujas de aire son capturadas en una red de gotitas de grasa y el coloide resultante adquiere aproximadamente el doble de volumen de la nata original; sin embargo, si el proceso de batido continúa las gotas de grasa se pegan entre sí destruyendo el coloide y formando mantequilla y el líquido restante es suero de mantequilla. (39)

**Crema UHT:** es la que ha sido sometida a tratamiento térmico de ultra alta temperatura, mediante un tratamiento térmico tecnológicamente adecuado. La crema UHT o UAT podrá designarse además "Crema Larga vida". La crema sometida al proceso de homogenización deberá designarse además como "homogenizada". (40)

**Crustáceos:** incluyen varios grupos de animales como las langostas, los camarones, los cangrejos, los langostinos y los percebes. Los crustáceos son fundamentalmente acuáticos y habitan en todas las profundidades, tanto en el medio marino, salobre y de agua dulce; unos pocos han colonizado el medio terrestre, como la cochinilla de la humedad (isópodos). Los crustáceos son uno de los grupos zoológicos con mayor éxito biológico, tanto por el número de especies vivientes como por la diversidad de hábitats que colonizan; dominan los mares, como los insectos dominan la tierra. Son los únicos artrópodos con dos pares de antenas, tienen al menos un par de maxilas y pasan por períodos de muda e intermuda para poder crecer. Todos excepto Cirripedia son de sexos separados. (41)

**Crustáceos en conserva:** producto alimenticio elaborado con especies comestibles de crustáceo fresco y limpio, pelado o despicado, con tratamiento térmico antes y después de colocarse en envases sanitarios herméticamente cerrados y sometidos a proceso de esterilización comercial que asegure su conservación. (42)

**Derivados congelados del huevo:** obtenidos por congelación a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  de los huevos líquidos, para su conservación necesitan solo  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (43)

**Derivados líquidos del huevo:** puede ser del contenido total del huevo o bien la clara y yema por separado. Los huevos se examinan cuidadosamente, después se rompen a mano o a máquina, se filtran, se homogenizan y por último se pasteurizan para conseguir una mezcla homogénea libre de microorganismos. (43)

**Derivados secos del huevo:** huevos deshidratados o en polvo, obtenidos por desecación de los anteriores. (43)

**Dulce de leche:** también conocido manjar, manjar blanco, arequipe o cajeta es un dulce tradicional de Sudamérica y que corresponde a una variante caramelizada de la leche. (44)

**Edulcorante:** es un aditivo para los alimentos que duplica el efecto del azúcar, pero que usualmente tiene menos energía. Algunos extractos del azúcar son naturales y algunos son sintéticos. Aquellos que no son naturales en general son conocidos como edulcorantes artificiales. Una clase importante de sustitutos del azúcar son conocidos como edulcorantes de alta intensidad. Éstos tienen una dulzura varias veces a la del azúcar común de mesa. Como resultado, mucho menos edulcorante es requerido y la contribución y energía es a menudo insignificante. La sensación de dulzor causada por estos componentes es a veces notablemente diferente de la sacarosa, de manera que frecuentemente éstos son usados con mezclas complejas que alcanzan una sensación de dulzor más natural. Si la sacarosa (u otro azúcar) reemplazado ha contribuido a la textura del producto, entonces frecuentemente también se necesita un agente de relleno. Esto puede ser visto en bebidas suaves etiquetadas como "dietéticas" o "light", las cuales contienen edulcorantes artificiales y frecuentemente tienen una sensación al paladar notablemente diferente, o en los sustitutos del azúcar de mesa, que mezclan maltodextrinas como un edulcorante intenso para alcanzar una sensación de textura satisfactoria. (45)

**Emulsión:** es una mezcla de dos líquidos inmiscibles de manera más o menos homogénea. Un líquido (la fase dispersa) es dispersado en otro (la fase continua o fase dispersante). Muchas emulsiones son emulsiones de aceite/agua, con grasas alimenticias como uno de los tipos más comunes de aceites encontrados en la vida diaria. Ejemplos de emulsiones incluyen la mantequilla y la margarina, la leche y crema, la mayonesa. En el caso de la

mantequilla y la margarina, la grasa rodea las gotitas de agua (en una emulsión de agua en aceite); en la leche y la crema el agua rodea las gotitas de grasa (en una emulsión de aceite en agua). (46)

**Equinodermos:** son un filo de animales deuteróstomos exclusivamente marinos y bentónicos. Su nombre alude a su exclusivo esqueleto interno formado por osículos calcáreos. Poseen simetría pentarradial secundaria, caso único en el reino animal, y un sistema vascular acuífero característico. (47)

**Especia:** también llamada condimento es el nombre dado a ciertos aromatizantes de origen vegetal, que se usan para preservar o sazonar los alimentos. Técnicamente se considera una especia a las partes duras, como las semillas o cortezas, de ciertas plantas aromáticas, aunque por similitud, muchas veces también se engloba a las fragantes hojas de algunas plantas herbáceas, cuyo nombre real es hierbas. (48)

**Espicias y plantas aromáticas desecadas:** componentes naturales desecados, o las mezclas de los mismos, utilizados para sazonar, condimentar y dar aroma y sabor a los alimentos. Este término aplica por igual a las especias enteras, quebradas o molidas. (49)

**Formulas lácteas:** se prepara a partir de leche en polvo que se le extrajo la grasa y se le adiciona grasa vegetal y agua. (50)

**Fritura:** es un tipo de cocción seca, donde el alimento o producto se somete a una inmersión rápida en un recipiente lleno de materia grasa muy caliente (170 °C). Cuando está bien realizada y a la temperatura adecuada, el resultado es un alimento seco, crujiente y dorado. (51)

**Frutas:** son un conjunto de alimentos vegetales que proceden del fruto de determinadas plantas, ya sean hierbas como la melonera o árboles como el albaricoquero. Las frutas poseen un sabor y un aroma característicos y presentan unas propiedades nutritivas y una composición química que las distingue de otros alimentos. (52)

**Fruta congelada:** es el producto preparado con frutas frescas, limpias, sanas, maduras, sin tallo y de textura firme, que se ajustan a las características de las especies propias de cada fruta. (53)

**Fruta desecada:** es la fruta que tras un proceso de desecación natural (aire) se puede consumir a los meses, e incluso años después de su recolección. (54)

**Fruta deshidratada:** es la fruta que sufre un proceso de secado por procedimientos tecnológicos. (54)

**Fruta fresca:** cuando el consumo se realiza inmediatamente o a los pocos días de su recolección, de forma directa, sin ningún tipo preparación o cocinado. (55)

**Frutas y hortalizas procesadas:** Son aquellas hortalizas y frutas frescas, limpias, peladas enteras y/o cortadas de diferentes maneras, cuyo mínimo procesamiento permite mantener sus propiedades naturales y tornarlas fáciles de utilizar por el consumidor ya sea para consumo directo crudo o para preparaciones culinarias, las que se presentarán envasadas al vacío o en atmósferas modificadas con o sin utilización de gases. (56)

**Galleta:** es un pastel horneado, hecho con una pasta a base de harina, mantequilla, azúcar y huevos. Además de los indicados como básicos, las galletas pueden incorporar otros ingredientes que hacen que la variedad sea

muy grande. Pueden ser saladas o dulces, simples o rellenas, o con diferentes agregados de cosas (como frutos secos, chocolate, mermelada y otros). (57)

**Grasa:** es un término genérico para designar varias clases de lípidos, aunque generalmente se refiere a los acilglicéridos, ésteres en los que uno, dos o tres ácidos grasos se unen a una molécula de glicerina, formando monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos respectivamente. Las grasas están presentes en muchos organismos, y tienen funciones tanto estructurales como metabólicas. El tipo más común de grasa es aquél en que tres ácidos grasos están unidos a la molécula de glicerina, recibiendo el nombre de triglicéridos o triacilglicéridos. Los triglicéridos sólidos a temperatura ambiente son denominados grasas, mientras que los que son líquidos son conocidos como aceites. (58)

**Helado:** o crema helada es un postre congelado hecho de leche, nata o natillas combinadas con saborizantes, edulcorantes y azúcar. En general los productos utilizados en su elaboración son: leche, azúcar, edulcorantes, nata de leche, huevo, frutas, chocolate, frutos secos, yogurt, agua mineral y estabilizantes. (59)

**Hielo:** es agua en estado sólido. Ciertas formas congeladas de otras sustancias como el dióxido de carbono, también se conocen como hielo. El hielo es incoloro y transparente, y cristaliza en el sistema hexagonal. Su punto de fusión es de 0 °C; el agua pura también se solidifica a 0 °C, el hielo sólo se formará a 0 °C si el agua está turbia o contaminada con polvo u otros objetos. (60)

**Hortalizas:** nombra a un conjunto de plantas cultivadas generalmente en huertas o regadíos, que se consumen como alimento, ya sea de forma cruda o preparada culinariamente, y que incluye a las verduras y a las legumbres verdes (las habas y los guisantes). Las hortalizas no incluyen a las frutas ni a los cereales. (61)

**Huevos:** constituyen un alimento habitual y básico en la especie humana, se presenta protegido por cáscara y su contenido es proteínas (principalmente en albúmina que es la clara o parte blanca del huevo) y lípidos, de fácil digestión, son el componente principal de múltiples platos dulces y salados, y son un complemento imprescindible en muchos otros debido a sus propiedades aglutinantes. (62)

**Huevo líquido pasteurizado:** producto obtenido a partir del huevo completo líquido, homogenizado y pasteurizado, una vez eliminadas las cáscaras y membranas, que pueden ser completados por otros productos alimenticios o aditivos destinados a servir de materia prima para la elaboración de productos alimenticios para el consumo humano. (63)

**Infusión:** es aquella preparada con hojas de yerba mate (planta originaria de las cuencas de los ríos Paraná, Paraguay y Uruguay). Estas plantas previamente secadas, cortadas y molidas forman la yerba mate, la cual tiene sabor amargo debido a los taninos de sus hojas. (64)

**Jaleas:** son una preparación de consistencia untuosa y gelatinosa, elaboradas a partir de jugos o extractos de frutas frescas por cocción con igual cantidad de azúcar y adición de pectinas. (65)

**Leche:** es una secreción nutritiva de color blanquecino opaco producida por las glándulas mamarias de las hembras (a veces también por los machos) de los mamíferos (incluidos los monotremas). La leche es la base de numerosos productos lácteos, como la mantequilla, el queso, el yogur, entre otros. Es muy frecuente el empleo de los derivados de la leche en las industrias agroalimentarias, químicas y farmacéuticas en productos como la leche condensada, leche en polvo, caseína o lactosa. La leche de vaca se utiliza

también en la alimentación animal. Está compuesta principalmente por agua, iones (sal, minerales y calcio), hidratos de carbono (lactosa), materia grasa y proteínas. El líquido es producido por las células secretoras de las glándulas mamarias o mamas (llamadas "pechos" entre muchas otras formas, en el caso de la mujer, y "ubres", en el caso de los mamíferos domésticos). (66)

**Leche condensada: o leche condensada azucarada** es leche de vaca a la que se le ha extraído agua y agregado azúcar, lo que resulta en un producto espeso y de sabor dulce que puede conservarse varios años. (67)

**Leche deshidratada:** se obtiene mediante la deshidratación de leche pasteurizada. Este proceso se lleva a cabo en torres especiales de atomización, en donde el agua que contiene la leche es evaporada, obteniendo un polvo de color blanco amarillento que conserva las propiedades naturales de la leche. Para beberla, el polvo debe disolverse en agua potable. Este producto es de gran importancia ya que, a diferencia de la leche fluida, no precisa ser conservada en frío y por lo tanto su vida útil es más prolongada. (68)

**Leche evaporada:** es un lácteo que se ofrece enlatado y que soporta grandes periodos de almacenamiento debido a los procesos de "deshidratación" realizados a la leche cruda, a los que se les ha quitado cerca de un 60% del agua existente en la leche. Su aspecto concentrado difiere de la leche condensada, aunque también se las denomina indistintamente por su similitud esencial, en que esta última posee agregado de azúcar con el objeto de inhibir el crecimiento bacteriano, mientras que la leche evaporada no contiene azúcar. Aunque coloquialmente se le conoce como *leche evaporada* su nombre real es el de leche *parcialmente evaporada* ó semi-evaporada ya que en su proceso de elaboración se le ha quitado cerca de un 60% del agua existente en la leche no el 100%. (69)

**Leche fluida (entera):** se entiende con éste nombre a la leche a granel higienizada, enfriada y mantenida a 5°C, sometida opcionalmente a terminación, pasteurización y/o estandarización de materia grasa, transportada en volúmenes de una industria láctea a otra para ser procesada y envasada bajo normas de higiene. La leche fluida entera puede ser sometida a procedimientos de higienización por calor. Procesos de ultra alta temperatura (UAT ó UHT), que consisten en llevar la leche homogenizada a temperaturas de 130°C a 150°C durante 2 a 4 segundos, permiten higienizarla de forma apropiada y de manera que estas puedan llegar en forma segura al consumidor.

(70)

**Leche pasteurizada:** pasteurizar la leche es destruir en ella, por el empleo apropiado de calor, casi toda su flora banal y la totalidad de la flora patógena, procurando alterar lo menos posible su estructura físico -química, valor nutritivo y características organolépticas. (70)

**Leche UHT:** se denomina leche UHT a la leche natural, entera, semidesnatada o desnatada, sometida a un calentamiento en condiciones tales de temperatura y tiempo que asegure la destrucción de los microorganismos y la inactivación de las formas de resistencia, y envasada posteriormente en condiciones asépticas.(70)

**Manteca de maní:** (o de cacahuates o cacahuetes) es una pasta elaborada de maníes tostados y molidos, generalmente bien salada o endulzada. (71)

**Mantequilla:** sustancia grasa, de color amarillo claro, que se obtiene de la leche de vaca por agitación. (72)

**Margarinas:** son productos de consistencia diferente, compuestos básicamente de grasas emulsionadas con agua. La parte grasa está constituida por aceites vegetales o animales, endurecidos mediante hidrogenación. Son exentos de colesterol pero, tratándose de grasas sólidas, su uso en la alimentación no es aconsejable. (73)

**Mermeladas:** son productos de consistencia pastosa y untuosa elaborados con fruta fresca generalmente de un solo tipo, separada de huesos y semilla. (74)

**Mayonesa:** o mahonesa es una salsa emulsionada fría elaborada principalmente a base de huevo entero y aceite vegetal batidos. Generalmente se la sazona con sal, zumo de limón y/o vinagre. (75)

**Mazapán:** es un dulce cuyos ingredientes principales son almendras y azúcar, en distinta proporción dependiendo de la receta y el lugar. (76)

**Miel:** es un fluido dulce y viscoso producido por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores de plantas. Las abejas lo recogen, transforman y combinan con la enzima invertasa que contiene la saliva de las abejas y lo almacenan en los panales donde madura. Además la miel es una secreción que fue consumida anteriormente por estas. (77)

**Moluscos bivalvos congelados rápidamente:** son un producto preparado a partir de moluscos bivalvos vivos que se congelan rápidamente tras una preparación idónea. (78)

**Moluscos bivalvos en conserva:** son un producto preparado a partir de porciones comestibles de moluscos bivalvos frescos, congelados, cocidos,

ahumados o no ahumados a las que puede haberse añadido sal, agua y/o aceites comestibles, otros ingredientes y un medio de cobertura. (78)

**Moluscos bivalvos vivos:** son un producto que está vivo inmediatamente antes de su consumo. El producto se presenta con la concha y no está preparado aunque puede habersele añadido un medio de cobertura, sal, agua y/o aceites comestibles y otros ingredientes. (78)

**Mostaza:** hace referencia generalmente al condimento envasado con apariencia externa pastosa y de sabor picante que se elabora de las semillas de varias plantas del género *Sinapis*, familia de las crucíferas, que también incluye las coles y los nabos. Asimismo, hace referencia también a la pequeña semilla de mostaza, usada como especia. (79)

**Muffins:** Panecillos dulces que suelen acompañar el té, típicos de Inglaterra. (80)

**Nectar:** al producto constituido por la pulpa de fruta finamente tamizada, con adición de agua potable, azúcar, ácido cítrico, preservante químico y estabilizador si fuera necesario. (81)

**Nueces:** Fruto del nogal. Es una drupa ovoide, de tres o cuatro centímetros de diámetro, con el epicarpio fino y liso, de color verde con pintas negruzcas, el mesocarpio correoso y caedizo, y el endocarpio duro, pardusco, rugoso y dividido en dos mitades simétricas, que encierran la semilla, desprovista de albumen y con dos cotiledones gruesos, comestibles y muy oleaginosos. (82)

**Pan:** es el horneado de una masa elaborada fundamentalmente con harina de cereales, sal y agua. La mezcla en algunas ocasiones suele contener levaduras para que fermente la masa y sea más esponjosa y tierna. El cereal más

utilizado para la elaboración del pan es la harina de trigo, también se utiliza el centeno, la cebada, el maíz, el arroz. <sup>(83)</sup>

**Pasta:** alimentos preparados con una masa cuyo ingrediente básico es la harina, mezclada con agua, y a la cual se puede añadir sal, huevo u otros ingredientes, conformando un producto que generalmente se cuece en agua hirviendo. <sup>(84)</sup>

**Pastel:** es una masa de harina y manteca, cocida al horno, en el que ordinariamente se envuelve crema o dulce, y a veces fruta, pescado o carne. <sup>(85)</sup>

**Pescado:** son los peces que han sido extraídos de su medio natural, para su utilización como alimento. <sup>(86)</sup>

**Pescado ahumado:** El ahumado es un proceso que por lo general incluye las operaciones de salado y secado. La acción conservadora del ahumado se debe tanto a la pérdida de agua de la carne del pescado como a las sustancias presentes en el humo de acción bactericida y al añadido de sal. El contenido en sal de la mayoría de los ahumados oscila entre el 2 y el 4%. Para el ahumado se emplea el humo procedente de maderas no resinosas, a veces aromáticas, como el roble, el haya o el laurel, etc. El proceso de ahumado se puede llevar a cabo en frío o en caliente. Si el ahumado se realiza en frío y con poca sal, es necesaria la refrigeración., abadejo, eglefino o liba, faneca, boquerón y atún. <sup>(87)</sup>

**Pescado salado:** La sal se utiliza de forma conjunta con la desecación (bacalao seco), con el humo (ahumados) o con el vinagre (encurtidos). Además de la reducción del contenido de agua del alimento, impide el desarrollo de gérmenes patógenos. El proceso de salado se puede llevar a cabo en seco, con el alimento en contacto directo con sal, o introduciéndolo en una salmuera, lo

que se conoce con el nombre de salado húmedo. Hay productos que se someten a un salado mixto, que combina el salado en seco y el húmedo. Los pescados más habituales que se someten a salado son: sardinas, arenques, bacalao. (87)

**Piezas íntegras curadas y ahumadas:** son los productos cárnicos elaborados con piezas anatómicas íntegras y aditivos permitidos, con adición o no de extensores, en los que los procesos de ahumado, curado y cocción tienen un papel principal. Incluyen: jamones, tocineta, lomo ahumado, lacón y otros. (88)

**Postre:** es el plato de sabor dulce que se toma al final de la comida. Cuando se habla de postres se entiende alguna preparación dulce, bien sean cremas, tartas, pasteles, helados, bombones, etc. (89)

**Productos cárnicos:** son aquellos productos que contengan carne de mamíferos y/o aves de corral y/o caza destinada al consumo humano. (90)

**Productos cárnicos crudos:** son aquéllos sometidos a un proceso tecnológico que no incluye un tratamiento térmico. (90)

**Productos cárnicos crudos frescos:** son los productos crudos elaborados con carne y grasa molidas, con adición o no de subproductos y/o extensores y/o aditivos permitidos, embutidos o no, que pueden ser curados o no y ahumados o no. Incluyen: hamburguesas, longanizas, picadillo extendido, masas crudas y otros. (90)

**Productos cárnicos crudos salados:** son los productos crudos elaborados con piezas de carne o subproductos y conservados por medio de un proceso de

salado, pudiendo ser curados o no, ahumados o no y secados o no. Incluyen: menudos salados, tocino, tasajo. <sup>(90)</sup>

**Productos cárnicos embutidos y moldeados:** son aquéllos elaborados con un tipo de carne o una mezcla de 2 o más carnes y grasa, molidas y/o picadas, crudas o cocinadas, con adición o no de subproductos y/o extensores y/o aditivos permitidos, colocados en tripas naturales o artificiales o moldes y que se someten a uno o más de los tratamientos de curado, secado, ahumado y cocción. <sup>(90)</sup>

**Productos cárnicos tratados con calor:** son los que durante su elaboración han sido sometidos a algún tipo de tratamiento térmico. <sup>(90)</sup>

**Productos cárnicos semielaborados:** son los elaborados con carne molida o picada o en piezas, con adición o no de tejido graso, subproductos, extensores y aditivos permitidos, que han recibido un tratamiento térmico durante su elaboración, pero que necesitan ser cocinados para consumirlos. Incluyen: croquetas, productos reconstituidos (“reestructurados”), productos conformados (“palitos” de carne, “nuggets”, otros productos empanados) y productos semicocidos. <sup>(90)</sup>

**Producto concentrado:** un producto concentrado es aquel que está diseñado para ser aplicado a diluciones importantes, conservando su eficacia y características principales. <sup>(91)</sup>

**Productos de confitería:** aquellos cuyo ingrediente principal es el azúcar (sacarosa) u otros azúcares comestibles (glucosa, fructosa, etc). Junto a una serie de productos alimenticios tales como harinas, huevos, nata, chocolate, grasa y aceites, zumos de frutas, etc. <sup>(92)</sup>

**Pupusa:** es una tortilla de maíz gruesa hecha a mano (hecha usando masa de maíz, una masa de harina de maíz usada en la cocina latinoamericana) que está rellena con uno o más de los siguientes ingredientes. <sup>(93)</sup>

**Queso fresco** (o queso blanco) es un tipo de queso blando, es decir retiene gran parte del suero y no tiene proceso de maduración o refinado. <sup>(94)</sup>

**Queso madurado:** es el queso que no está listo para el consumo poco después de la fabricación, sino que debe mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en unas condiciones tales que se produzcan los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos del queso. <sup>(4)</sup>

**Queso procesado** ( queso manufacturado o queso fundido) es un producto lácteo elaborado a partir de queso y a veces de algunos productos lácteos fermentados a los que se añade un emulgente (sales fundentes), algo de sal y algo de colorante alimenticio. <sup>(95)</sup>

**Queques:** son los que se hacen mezclando una melaza o miel de panela enfiada, coco rallado, leche, harina y bicarbonato. La masa se deja reposar y se mete en un molde enmantecado y enharinado al horno por 30 minutos. Cuando se enfría se corta en cuadros. <sup>(96)</sup>

**Requesón:** es un producto lácteo similar al queso, obtenido de un segundo procesamiento del suero lácteo producido como derivado en la elaboración de quesos de pasta blanda. <sup>(97)</sup>

**Salsa:** es una mezcla líquida de ingredientes (fríos o calientes) que tienen por objeto acompañar a un plato. La consistencia líquida (o semi-líquida) de una salsa puede cubrir una muy amplia gama que puede ir desde el puré a la más

líquida de un caldo. El objetivo de la salsa es acompañar a otras comidas como un aderezo mejorando el sabor, haciendo un contraste o complementando, es por este motivo que suelen ofrecer al paladar sensaciones relativamente marcadas que estimulen los sentidos del paladar y de los aromas. (98)

**Salsa de tomate:** es una salsa o pasta elaborada principalmente a partir de pulpa de tomates, a la que se le añade, dependiendo del tipo particular de salsa y del país en que sea elaborada. (99)

**Semilla** (o pepita) es cada uno de los cuerpos que forman parte del fruto que da origen a una nueva planta, es la estructura mediante la que realizan la propagación las plantas que por ello se llaman espermatófitas (plantas con semilla). La semilla se produce por la maduración de un óvulo de una gimnosperma o de una angiosperma. Una semilla contiene un embrión del que puede desarrollarse una nueva planta bajo condiciones apropiadas. Pero también contiene una fuente de alimento almacenado y está envuelto en una cubierta protectora. (100)

**Snacks:** son un tipo de alimento que en la cultura occidental no es considerado como uno de los alimentos principales del día (desayuno, almuerzo, comida, merienda o cena). Generalmente se utiliza para satisfacer el hambre temporalmente, proporcionar una mínima cantidad de energía para el cuerpo, o simplemente por placer. Estos alimentos contienen a menudo cantidades importantes de edulcorantes, conservantes, saborizantes, sal, y otros ingredientes atractivos como el chocolate, cacahuetes (maní) y sabores especialmente diseñados (como en las papas fritas condimentadas). (101)

**Sopa:** es una preparación consistente en un caldo alimenticio en el cual se han cocido vegetales o productos cárnicos. Suele proceder de una preparación

culinaria con evaporación, como es el cocido o mediante retención de vapores: estofado. (102)

**Tamal:** son preparados generalmente con masa de maíz cocida normalmente al vapor, envuelto en hojas de la mazorca de la misma planta de maíz o de plátano, maguey, aguacate e incluso papel aluminio o plástico. Pueden llevar o no relleno, el cual puede contener carne, vegetales, chile, frutas, salsa, etc. Además pueden tener sabor dulce o salado. (103)

**Torta:** se refiere a una clase de sándwich o bocadillo elaborado con pan de sal (telera, bolillo, virote, micha, etc) al cual se le parte por la mitad y se le rellena con diversos tipos de comida, como pueden ser guisos, jaleas, carnes, etc. Las tortas se pueden comer tanto frías como calientes. (104)

**Tortilla:** es una preparación alimenticia elaborada a base de masa de maíz nixtamalizado. Tiene forma circular y aplanada. (105)

**Turrón:** es una masa dulce obtenida por la cocción de miel (o azúcares) a la que se incorporan almendras peladas y tostadas. A dicha masa se le puede añadir clara de huevo para que emulsione. Dicha pasta es posteriormente amasada y tradicionalmente se le da forma final de tableta rectangular o torta. (106)

**Yema:** constituye la célula huevo que originará, de estar fecundado, un nuevo organismo. La yema supone una reserva energética para el desarrollo del embrión. Se le conoce a nivel científico como **vitelo**. Los huevos de gallina, son los huevos más ampliamente difundidos en la gastronomía. (107)

**Yogur** (también conocido como yogurt) es un producto lácteo obtenido mediante la fermentación bacteriana de la leche. Si bien se puede emplear cualquier tipo de leche, la producción actual usa predominantemente leche de vaca. La fermentación de la lactosa (el azúcar de la leche) en ácido láctico es lo que da al yogur su textura y sabor tan distintivo. A menudo se le añade fruta, vainilla, chocolate y otros saborizantes. <sup>(108)</sup>