

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA,
MANAGUA
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD
Dr. LUIS FELIPE MONCADA**



Monografía para optar el título de Licenciatura en Microbiología

TEMA:

Evaluación microbiológica de productos lácteos artesanales: Leche cruda, queso fresco, quesillo y cuajada elaborados en la finca San Diego, del Municipio de Cuapa (Chontales), Noviembre-Diciembre 2016.

AUTORES:

Bra. Katherinne Dayanara Mena Lozano

Bra. Janelys Elieth Solís López

Bra. Ana Teresa Urbina Rodríguez

TUTOR:

Isaac Abraham Martínez Marcia

MSC. Microbiología médica UNAN-León

ASESOR METODOLÓGICO:

Roberto Enrique Flores Díaz

Lic. Bioanálisis Clínico

Managua, Febrero 2017

DEDICATORIA

A Dios por ser nuestro protector, fortaleza y el maestro que guía cada uno de nuestros pasos.

A nuestros padres por su dedicación, paciencia, confianza, compañía y esfuerzo para que nuestros anhelados sueños se hagan realidad.

A nuestros docentes, por su tiempo y dedicación, por guiarnos en nuestro crecimiento personal y formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a nuestros Padres

A Dios todopoderoso por brindarnos la oportunidad de obtener este triunfo personal y profesional, darnos salud, sabiduría y entendimiento para lograr la meta, a nuestros padres por ser los principales promotores de nuestros sueños, gracias a ellos por confiar y creer en nosotras.

A nuestra Universidad y Docentes

Por permitirnos ser parte de ella y por haber abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar nuestra carrera, y a nuestros docentes que nos brindaron sus conocimientos y apoyo para seguir adelante día a día.

A nuestro tutor Msc. Isaac Abraham Martínez Marcia

Gracias por su esfuerzo, dedicación, paciencia, motivación y entrega que sobrepaso las expectativas que como alumnas depositamos en su persona, las cuales fueron fundamentales para culminar nuestra formación profesional.

A nuestro asesor metodológico Lic. Roberto Enrique Flores Díaz

Por su asesoría en la elaboración de este trabajo, por habernos transmitido sus conocimientos y orientarnos en el transcurso de nuestra investigación.

A Lic. Martha Emelina Delgado, directora del laboratorio del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR), por habernos permitido llevar a cabo nuestra investigación en las instalaciones de dicho centro, que fue parte fundamental para culminar el estudio.

OPINIÓN DEL TUTOR

Las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos causan más de 200 enfermedades entre las que se encuentran las diarreas y la aparición de cáncer. Estos hechos han ocasionado un problema para la salud de la población que nos ha llevado a estar alertas en lo que respecta a la aparición de patógenos como: *E. coli*, *Salmonella ssp*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* en los diferentes tipos de alimentos.

El tema “Evaluación microbiológica de productos lácteos artesanales: Leche cruda, queso fresco, quesillo y cuajada elaborados en la finca San Diego, del Municipio de Cuapa (Chontales), Noviembre-Diciembre 2016”. Marca una realidad de lo que si tenemos que estar vigilando en el país, no permitiendo que nuestra población se enferme por la falta de investigación o de gestión en el cumplimiento de las medidas higiénico sanitarias en lo que respecta a la elaboración de estos productos artesanales.

Quiero resaltar el esfuerzo que han hecho las estudiantes al ser un equipo trabajador, impecable en su disciplina y colaboración con el departamento de Aguas y Alimentos. Por lo que solo me basta felicitarlas y desearles éxitos en su futuro.

Dado en la ciudad de Managua a los 11 días del mes de Enero del 2017.

Isaac Abraham Martínez Marcia
Bioanalista Clínico UNAN-Managua
Master en Microbiología Médica UNAN-León

RESUMEN

Hoy en día la leche y sus derivados ocupan un lugar importante entre los consumos alimentarios naturales pero también puede ser vehículo de bacterias patógenas para el hombre. La inocuidad de la leche y productos lácteos dependen del cuidado empleado en el ordeño, en la limpieza y en la manipulación de los utensilios, así como en la elaboración de estos.

Por esta razón, se realizó esta investigación, que comprende la evaluación microbiológica de productos lácteos, elaborados en la finca San Diego, del Municipio de Cuapa, Chontales; en el periodo comprendido entre Noviembre y Diciembre 2016 para determinar la presencia de *E. Coli*, *S. aureus*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*.

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, no probabilístico por conveniencia. Donde la muestra de estudio fue conformado por leche cruda como materia prima y 3 productos lácteos conformados por queso fresco, quesillo y cuajada; de los cuales se tomó 1 lote y de estos 5 submuestras. De igual manera se tomaron muestras de hisopados de manos de manipuladores, ordeñadores, hisopados de superficies en utensilios y análisis microbiológico de agua de grifo y pozo.

Se obtuvo como resultado un 100% de positividad para *Escherichia coli*, y un 35% para *Staphylococcus aureus*, ausencia de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp* por métodos convencionales, superando el rango máximo permitido según las Normas NTON 03 065-06. Mediante la implementación de la PCR Tiempo Real se obtuvo un 5% de muestras positivas para *Salmonella spp*, y 0% para *Listeria monocytogenes*.

En el análisis de las condiciones higiénico-sanitarias que se realizó durante el proceso de elaboración de los productos se encontró la presencia de Coliformes Fecales, Totales y *Escherichia coli* en utensilios, hisopados de manos de los manipuladores y el personal de ordeño, de igual manera se encontró Coliformes Totales y Fecales en el agua de pozo, siendo uno de los principales factores de contaminación; solamente el agua de grifo cumplía con los requisitos de aceptación.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	2
III.	JUSTIFICACIÓN	4
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
V.	OBJETIVOS	6
VI.	MARCO TEÓRICO	7
VII.	DISEÑO METODOLÓGICO	27
VIII.	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	34
IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
X.	CONCLUSIÓN	46
XI.	RECOMENDACIONES	47
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	48

ANEXOS

I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día la leche y sus derivados ocupan un lugar importante entre los consumos alimentarios naturales de las grandes ciudades, los productos lácteos en la actualidad son de fácil acceso para gran parte de la población. Las características nutricionales como: proteínas, carbohidratos, calorías, minerales y agua hacen de la misma un alimento completo para la dieta de los seres humanos, también la hacen un medio de cultivo ideal para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos. En general se puede resumir la importancia del estudio microbiológico de la leche y sus derivados basado en algunos aspectos como por ejemplo: los microorganismos producen cambios deseables en las características físico-químicas de la leche, durante la elaboración de diversos productos lácteos y estos pueden contaminarse con microorganismos patógenos o sus toxinas y provocar enfermedad en el consumidor.

Las condiciones de higiene y sanidad en las explotaciones lecheras tienen un efecto importante en la calidad microbiológica de la leche, cuanto mayores sean los cuidados aplicados a la obtención higiénica de la leche y a la sanidad de los animales productores de leche, menores serán los contenidos microbianos en la misma. Así mismo, corrales libres de estiércol y lodo, salas de ordeño limpias, equipo de ordeño funcionando de manera adecuada y una rutina de ordeño correcta, resultarán en una baja incidencia de mastitis.

Durante su transporte y almacenamiento, así como durante la elaboración de los productos, las fuentes de contaminación son las superficies que contactan con los mismos: botes lecheros, pipas, tanques de almacenamiento, bombas, tuberías, filtros, entre otros. La leche, por su composición, es muy susceptible de sufrir alteraciones debidas al crecimiento microbiano en la misma, particularmente cuando la temperatura de conservación no es la adecuada.

II. ANTECEDENTES

Rubio Lozano et al., en el 2006 realizaron un estudio para la detección de *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en vía pública en la Ciudad de México; con el objetivo de determinar la inocuidad bacteriológica de los mismos, se realizó la detección simultánea de *Salmonella spp* y de *Listeria monocytogenes*, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como con los métodos bacteriológicos convencionales, según la normatividad correspondiente para cada microorganismo: nom-114-ssa1-1994 mexicana, que constituye un método para la determinación de *Salmonella spp* en alimentos y la nom-143-ssa1-1995 mexicana, que representa un método de prueba microbiológica para alimentos y determinación de *L. monocytogenes*. Estos analizaron 120 muestras seleccionadas al azar por métodos convencionales y PCR, resultando tres positivas por PCR a la presencia de *Salmonella spp*, y no detectándose la presencia de *L. monocytogenes*, resultando similar a los datos obtenidos por los métodos bacteriológicos.

Villalobos et al., en el 2007 realizaron un estudio donde se investigó la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos que se expenden en comercios públicos y municipales de Cumaná. Analizaron 60 muestras de quesos frescos. El aislamiento de las cepas de *Listeria spp* se realizó según la FDA y API *Listeria* y la caracterización molecularmente por PCR. Del total, 10 muestras fueron positivas por pruebas bioquímicas convencionales y API *Listeria* para el género *Listeria*. En la confirmación por PCR, se identificaron: Dos *L. monocytogenes*, una *L. welshimeri*, una *L. selligeri*, Cinco *L. innocua* y una *L. grayi*. Las dos *L. monocytogenes*, fueron positivas para el gen de la listeriolisina (hly).

En 2008 se realizó un estudio en la Universidad Nacional del Litoral, Argentina; en la que se expuso la utilización de microorganismos para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en la producción primaria de la leche, en la que no se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson superior a 0,8. Los coeficientes más importantes fueron hallados entre microorganismos termodúricos y enterobacterias (0,614), psicrotrofos y enterobacterias (0,534) y termodúricos y *S. aureus* (0,503). Las demás comparaciones mostraron coeficientes menores a 0,5. No detectándose muestras positivas para *Salmonella spp*. (Signorini, y otros, 2008)

En el año 2009 la Escuela de Ciencias de la Salud de la Universidad de Oriente, Venezuela; se realizó un estudio sobre la calidad sanitaria en queso artesanal tipo “telita”. Upata, estado Bolívar, Venezuela. Aquí se analizaron 60 muestras y se investigó *Staphylococcus aureus* (Coagulasa positiva) según Norma Venezolana COVENIN 1292-89 como indicador de manipulación; bacterias coliformes según COVENIN 1104-96 y presencia de *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal. Todos los crecimientos bacterianos correspondieron a *Staphylococcus coagulasa* negativos con recuentos de hasta 10^4 diluciones decimales. Coliformes totales con recuentos de hasta 10^5 NMP/g y coliformes fecales en concentración 10^4 NMP/g. *Escherichia coli* estuvo presente en 43,3% de los quesos. (Rodríguez, Caldas, & Ogeerally, 2009)

En la evaluación de la calidad e inocuidad de quesos frescos artesanales de tres regiones de una provincia de Cuba 2013. Se evaluó la calidad e inocuidad en quesos frescos artesanales y se analizó un total de 73 muestras colectadas de forma aleatoria. El conteo de coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*; se realizó mediante placas RidaCount. La determinación de *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* O157 y *Listeria monocytogenes* se efectuó por aislamiento en medios de cultivo selectivos. El conteo de microorganismos a 30°C y coliformes totales fueron superiores a 5×10^3 UFC/g y 5×10^2 UFC/g. El contenido de *Staphylococcus coagulasa* positivo se encontró por encima de 1×10^3 UFC/g y el conteo de *Escherichia coli* mostró valores superiores a 1×10^3 UFC/g. El conteo de hongos y levaduras mostró valores superiores a 5×10^3 UFC/g. En el 19% de las muestras analizadas se detectó la presencia de *Salmonella spp.*, y en el 14% estaba presente *Escherichia coli* O157 (Ailín Martínez, 2013)

Jirón Aragón et. al., en el 2007, realizarón una evaluación higiénico-sanitaria de queseras artesanales en el municipio de Camoapa, Boaco, Nicaragua. Encontrando que los valores microbiológicos en las muestras de queso, sobrepasaban los niveles recomendados por las normas internacionales de calidad de productos (NTON, COVENIN, CODEX Alimentarius), lo que indicaba el alto nivel de contaminación de los quesos producidos.

III. JUSTIFICACIÓN

El presente estudio es de mucha importancia porque permitirá realizar la evaluación microbiológica de: leche, queso, quesillo y cuajada; elaborados en la finca San Diego, del municipio de Cuapa, Chontales. Dichos productos son estudiados actualmente por todo el mundo debido a la presencia de patógenos como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* asociados principalmente a la transmisión de enfermedades a través de los alimentos.

La contaminación de los alimentos puede producirse en cualquier etapa del proceso, que va desde la producción hasta el consumo del mismo, causando efectos nocivos en la salud del consumidor. Según la OMS, las enfermedades diarreicas representan un 95% de las ETA en la región de las américas; las cuales están asociadas a la contaminación de los alimentos por *E.coli* y *Salmonella spp*.

Por esta razón el desarrollo de esta investigación va dirigida a evaluar y mejorar la calidad microbiológica de los productos lácteos elaborados en dicho lugar. Determinando el número de patógenos investigados para inferir en la protección de la salud del consumidor, proporcionándoles alimentos inocuos, sanos, completos y así evitar intoxicaciones alimentarias.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cómo evaluar microbiológicamente los productos lácteos artesanales: Leche cruda, queso fresco, quesillo y cuajada elaborados en la finca San Diego, del Municipio de Cuapa (Chontales), Noviembre-Diciembre 2016?

¿Cómo identificar la presencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en productos lácteos artesanales?

¿Por qué método no convencional se podrá detectar *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en productos lácteos artesanales?

¿En qué condiciones higiénico-sanitarias se elaboran los productos lácteos artesanales?

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar microbiológicamente los productos lácteos artesanales: Leche cruda, queso fresco, quesillo y cuajada elaborados en la finca San Diego, del Municipio de Cuapa (Chontales), Noviembre-Diciembre 2016.

Objetivos específicos:

- Identificarla presencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en productos lácteos artesanales por métodos convencionales según FDA-BAM.
- Detectar *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en productos lácteos artesanales por PCR Tiempo Real.
- Analizar las condiciones higiénico-sanitarias en las que se elaboran los productos lácteos artesanales.

VI. MARCO TEÓRICO

6.1. Generalidades de la leche

La leche es la secreción de las hembras de los mamíferos, que tiene la función de satisfacer los requerimientos nutricionales del recién nacido en sus primeros meses de vida.

El primer fluido segregado por la glándula mamaria es el calostro; una solución cremosa, amarilla y concentrada de grasas, vitaminas y proteínas, en especial inmunoglobulinas y anticuerpos. En el suero y formando una solución verdadera, se encuentran la lactosa, vitaminas hidrosolubles y diferentes sales. Como dispersión coloidal se encuentran la caseína dispersa como un gran número de partículas sólidas tan pequeñas que permanecen en suspensión, las proteínas del suero y el fosfato de calcio. Finalmente como emulsión, se encuentran los glóbulos de grasa y otros lípidos (Araneda, 2015)

❖ Derivados de la leche:

Queso fresco: Tienen un alto contenido en humedad y no han sufrido un proceso de maduración, por lo que suelen tener sabor a leche fresca o leche acidificada. Su consistencia suele ser pastosa y su color blanco. Los quesos frescos deben consumirse en pocos días y su transporte y conservación se deben hacer a temperaturas de 2/10°C. Se les suele conocer también como quesos ácidos, ya que la coagulación de la leche se lleva a cabo por acidificación de la misma, aun empleándose cuajo en muchos casos; son quesos sin corteza o con una corteza muy fina, que apenas se prensan, con lo que no eliminan mucho suero.

Quesillo: El quesillo es un queso fresco de producción artesanal. Obtenido por coagulación de la leche, por medio del cuajo y otras enzimas coagulantes apropiadas; complementado por la acción de bacterias lácticas específicas y mediante un proceso de elaboración conocido como filado o hilado que es el responsable de otorgarle al producto sus características particulares y distintivas.

Cuajada: La cuajada es un producto lácteo que se forma al separarse una parte de la leche del suero por acción del cuajo o de los ácidos, formando la masa para la primera fase del proceso de elaboración de la cuajada y dejando el suero en su estado líquido.

6.2. Fuentes de contaminación

❖ Contaminación inicial de la leche

Una vez que la leche ha atravesado el canal del pezón tiene un determinado número de bacterias. Es importante diferenciar y conocer el contenido de bacterias antes y después de la secreción. Es fundamental obtener la leche con un bajo recuento inicial de bacterias y refrigerarla inmediatamente de 4 a 8°C. Si se logra eso, se obtendrá bacteriológicamente hablando, una excelente materia prima.

❖ Contenido de bacterias de la leche antes de la secreción

Infecciones de la ubre: En infecciones agudas el contenido de bacterias de cuartos individuales al comienzo del ordeño puede superar el 1×10^6 UFC/ml.

Canal del pezón: Hay *Staphylococcus aureus* coagulasa positivos, *Micrococcaceae*, *Corinebacterium*, *estreptococos* no patógenos. Aun cuando se toma una muestra de leche desinfectando bien la punta del pezón durante 20 segundos con alcohol al 80%, no es posible eliminar esa flora. Trabajos de investigación han demostrado que la única forma de evitar esa flora del canal del pezón es, obtener la muestra de leche mediante punción de la cisterna de la ubre o del pezón.

❖ Contaminación postsecretoria

Piel de los pezones: Se encuentra una amplia variedad de bacterias que pueden multiplicarse en los restos de la leche. No obstante estas bacterias no influyen demasiado en el recuento total de bacterias ya que la proporción de bacterias provenientes de la piel de los pezones puede ser significativa cuando se ordeñan pezones sucios con barro y bosta, por el “efecto de lavado de los pezones”.

Las bacterias provenientes de la materia fecal como: *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria*, tienen un rol muy importante en la calidad de la leche y los subproductos. (Aycachi Inga, 2008)

6.3. Microorganismos en la leche

❖ Bacterias lácticas:

Son bacilos o cocos, gram-positivos, no esporulados y en general catalasa-negativos, con una amplia distribución y adaptabilidad a diferentes ambientes. Pueden producir un pH 4,0 en los alimentos con carbohidratos fermentables, inhibiendo el desarrollo de otras bacterias. Aunque son mesofílicas pueden crecer a 5-45°C.

❖ Microorganismos deteriorantes:

La leche cruda puede ser alterada por bacterias psicrótrofas, que son bacilos, no esporulados, gram-negativos, proteolíticos, con algunas cepas lipolíticas.

Los más frecuentes son *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* que provocan cambios en el aroma y el sabor del producto refrigerado. Otras especies son *P. fragi*, *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* y *Burkholderia cepacia* que llegan a través del suelo, forraje, agua, presencia de otros animales y también por los utensilios de ordeño y tanques de transporte o almacenamiento mal lavados.

El tiempo de generación de estas bacterias en la leche cruda es de 8-12 hs a 3°C y se reduce a 5,5-10 hs a 5°C, y si inicialmente había 1 ufc/mL en 5 días la leche puede estar totalmente alterada. Los miembros de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* llegan a la leche porque se encuentran presentes en las superficies externas de la vaca, el suelo, el forraje o el estiércol.

❖ Microorganismos Patógenos:

La microbiota normal de la ubre está compuesta principalmente por bacterias como *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus* alrededor del 50% seguido por *Corynebacterium spp*, *Escherichia coli* y otros. Las bacterias asociadas con más frecuencia a los casos de mastitis son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* y *E. coli*. También han sido aislados *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa* y *Corynebacterium bovis*. La *Brucella abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis* causan la brucelosis en vacas, cabras y ovejas provocando abortos y se debe mantener la vigilancia veterinaria para evitar la difusión de la zoonosis.

Las vacas enfermas también pueden introducir *Mycobacterium bovis* y *M. paratuberculosis*. Los agentes infecciosos como *Salmonella spp*, *Campylobacter spp* o *Yersinia enterocolitica* suelen ser encontrados en la leche como resultado de contaminación con materia fecal. El personal que realiza el ordeño manual, práctica poco las medidas sanitarias, pueden introducir en la leche *Micrococcos* y *Staphylococcus* procedentes de sus vías respiratorias. (UNSA)

a) Coliformes

La denominación de Coliformes se le otorga a todo aquel grupo de bacterias que tienen ciertas características bioquímicas en común y son de mucha importancia como indicadores de contaminación del agua y de los alimentos. El término Coliformes proviene de Coli de la bacteria principal de este grupo, el cual es la *Escherichia coli*. Como ya se sabe la bacteria *E. Coli* es de origen fecal; para distinguir a las demás que no son de origen fecal se utiliza el término de Coliformes Totales y a los de origen intestinal o fecal Coliformes Fecales.

El grupo de bacterias coliformes totales comprende todos los bacilos Gram-negativos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas en un lapso máximo de 48 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Este grupo está conformado por 4 géneros principalmente: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*.

El grupo de coliformes fecales, está constituido por bacterias Gram-negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de gas a las 48 horas de incubación a $44.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$. Este grupo no incluye una especie determinada, sin embargo la más prominente es *Escherichia coli*. (Micro de los Alimentos, 2008) (Velazquez & Al, 2009)

Epidemiología: El grupo coliformes está ampliamente distribuido en la naturaleza, se pueden encontrar en el agua, el suelo y los vegetales, y forman parte de la flora intestinal de los seres humanos y de los animales de sangre caliente y fría. Por lo tanto debido a estas características de sobrevivencia y la capacidad para multiplicarse fuera del intestino, el grupo coliformes se utiliza como indicador de contaminación fecal en agua; sin embargo, cuando los coliformes llegan a los alimentos, no sólo sobreviven, sino que se multiplican, por lo que en los alimentos el grupo coliformes adquiere un significado distinto al que recibe en el agua.

En productos alimenticios que han recibido un tratamiento térmico como pasteurización, horneado o cocción, se utilizan como indicadores de malas prácticas sanitarias. (Vazquez & Al.)

Transmisión: La principal vía de transmisión es fecal-oral.

b) *Escherichia coli*.

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas. Sin embargo algunas de ellas, como *E. coli* productora de toxina Shiga, pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos. (Organización mundial de la salud, 2016)

E. coli se caracteriza por poseer bacilos Gram negativos, no esporulante, producción de indol a partir de triptófano, no utilización de citrato como fuente de carbono y no producción de acetoina. Además, fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas. (Murray, Rosenthal, & Pfäuer)

Se distinguen seis cepas según su poder patógeno:

***Escherichia coli* entero patógena (ECEP):** Es el agente causal predominante de diarrea en niños que viven en países en vías de desarrollo, e interacciona con las células epiteliales produciendo una lesión histopatológica característica conocida como “adherencia / destrucción”.

***Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET):** Se parece mucho a *V. cholerae*, se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade, y elabora toxinas que producen diarrea. No hay cambios histológicos en las células de la mucosa y muy poca inflamación. Produce diarrea no sanguinolenta en niños y adultos.

***Escherichia coli* entero invasiva (ECEI):** Es inmóvil, no fermenta la lactosa. Invade el epitelio intestinal causando diarrea sanguinolenta en niños y adultos. Libera el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea, produciendo artritis y en algunos casos arterioesclerosis. Es una de las *E. coli* que causa más daño debido a la invasión que produce en el epitelio intestinal.

***Escherichia coli* entero hemorrágica o verotoxigénica (ECEH):** Producen vero toxinas que actúan en el colon. Sus síntomas son: primero colitis hemorrágica, luego síndrome urémico hemolítico y por último, púrpura trombocitopénica trombótica.

***Escherichia coli* entero agregativa (ECEA):** La capacidad de las cepas de *Escherichia coli* entero agregativa (ECEAgg) para sobrevivir largo tiempo en el intestino humano y la producción de una o más de las toxinas descritas, pudiera explicar la persistencia de las diarreas por ellas producidas. Se han aislado cepas de ECEAgg en niños con diarrea con sangre, aunque en la actualidad se desconoce si existen diferentes cepas agregativas relacionadas con diarreas persistentes u otras en relación con diarrea con sangre.

***Escherichia coli* adherencia difusa (ECAD):** Se adhiere a la totalidad de la superficie de las células epiteliales y habitualmente causa enfermedad en niños inmunológicamente no desarrollados o malnutridos. No se ha demostrado que pueda causar diarrea en niños mayores de un año de edad, ni en adultos y ancianos. (Méndez Flores, 2011)

Epidemiología: Un gran número de células de *E. coli* están presentes en el aparato digestivo, y estas bacterias son una causa frecuente de septicemia, meningitis neonatal, infecciones del aparato urinario y gastroenteritis. La mayoría de las infecciones son endógenas, es decir son capaces de producir una infección cuando las defensas del mismo se encuentran alteradas. (Murray, Rosenthal, & Pfäuer)

Transmisión: Las bacterias presentes en las ubres de las vacas o en los equipos de ordeño pueden también contaminar la leche cruda. La infección en los seres humanos generalmente ocurre por la ingestión de alimentos contaminados o por contaminación fecal-oral. (Sánchez Tarragó, s.f.)

c) *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia Staphylococaceae. *S. aureus* es una bacteria anaerobia facultativa gram positiva de 0,8 a 1 micra, productora de coagulasa y catalasa, inmóviles, no esporulados, típicamente agrupados en racimos, aunque en muestras clínicas pueden verse aislados en diplococos o cadenas.

Epidemiología: *Staphylococcus aureus* es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedad. El principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos.

Patogenicidad: La intoxicación alimentaria estafilocócica resulta del consumo de alimentos en los que se ha multiplicado por encima de 10^5 ufc/ g y producido enterotoxinas, es resistente al calor, a la radiación gamma y a la acción de las proteasas intestinales como la pepsina. La cantidad necesaria de enterotoxina requerida para causar la intoxicación es muy pequeña ($0,2 \mu\text{g} / \text{kg}$ en el hombre). Este nivel se alcanza en poblaciones de mayores de 10^5 células por gramo. A diferencia de otras enterotoxinas bacterianas las SEs no actúan directamente sobre el revestimiento del tracto intestinal, causando acumulación de líquido en asas intestinales ligadas. Actúan como superantígenos sobre el receptor de los linfocitos T colaboradores en el intestino y sobre centros nerviosos del intestino. La capacidad emética es la que las diferencia de otras PTSAGs. (Brizzio, 2009)

Transmisión: *Staphylococcus* se puede encontrar en el medio ambiente como puede ser: aire, polvo, superficies en donde se manejan alimentos y agua. En alimentos: por ejemplo los que presentan un alto contenido proteico, como puede ser la leche y derivados lácteos; y finalmente también se puede localizar en personas y animales. (Zendejas Manzo, Avalos Flores, & Soto Padilla, 2014)

d) Salmonella spp

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae. Son bacilos gramnegativos móviles que no fermentan la lactosa, aunque la mayoría producen sulfuro de hidrógeno o gas por fermentación de los hidratos de carbono. Inicialmente, se agrupan en más de 2000 especies en función de sus antígenos somáticos (O) y flagelares (H).

Salmonella pertenece a un grupo de bacterias que están presentes en el intestino de personas y animales sanos, de forma que las heces son el principal foco de contaminación en los alimentos y agua.

Cuando llega a los alimentos frescos, tiene la habilidad de multiplicarse muy rápidamente, y cuando una persona ingiere dicho alimento contaminando, el gran número de bacterias provoca “salmonelosis”, infección gastrointestinal provocada por dicha bacteria.

Epidemiología: La salmonelosis es una zoonosis de origen alimentaria, es decir que se transmite a los humanos a través del consumo de los productos alimenticios derivados de los animales contaminados con *Salmonella spp.* Por lo general, esta enfermedad suele producir diarrea, dolor abdominal y fiebre, aunque también puede venir acompañada de dolor de cabeza, náuseas y vómitos. La mayoría de los casos ocurren durante los meses del verano y en ocasiones pueden presentarse brotes, especialmente en escuelas, guarderías, restaurantes y residencias de ancianos. El período de incubación es por lo general de 8 a 72 horas.

La deshidratación ligada a los síntomas gastrointestinales hace que la Salmonelosis sea de especial importancia en personas con el sistema inmunitario débil, bebés y niños menores de 5, personas mayores de 60 años, y enfermos de cáncer, diabéticos, portadores del VIH, pacientes tratados con corticosteroides y otros grupos de riesgo; donde puede desencadenar problemas muy graves. (Elika, 2013)

Patogenicidad: Se puede clasificar la salmonelosis humana mediante dos grupos, las que son causadas por serotipos humanos, que suelen ocasionar síndromes tifoídicos y las que son debidos a serotipos más generales y que suelen causar diarreas, vómitos y fiebre. La duración de la enfermedad varía según el estado general del huésped. Una vez *Salmonella* ha superado las barreras y penetra en las células del hospedero, se necesitan aproximadamente $10^6 - 10^8$ bacterias para desarrollar la enfermedad sintomática. Aunque intervienen otros factores como el tipo de cepa, el tipo de alimento o el estado fisiológico del huésped. (Robledo, 2015)

Mecanismos de adherencia: La adherencia microbiana es necesaria para la supervivencia de un microorganismo y depende de la habilidad que posea la bacteria para adherirse. Este mecanismo necesita un receptor situado en la célula eucariota del huésped y la presencia de adhesinas, es decir, múltiples factores que lo adhieran al receptor.

Éstas son capaces de desencadenar una serie de respuestas biológicas como la activación de los linfocitos B, los neutrófilos o la secreción de citocinas, entre otras. Las múltiples adhesinas que se encuentran en los microorganismos se pueden agrupar en adhesinas fimbriales y adhesinas no fimbriales. Por lo general, en las bacterias Gram negativas las fimbrias (apéndices proteínicos) son más cortas y numerosas que los flagelos y no son responsables de la movilidad bacteriana. Los pelos (pili), en cambio, tienen una estructura parecida a las fimbrias pero suelen ser más largos y menos numerosos. Tanto las fimbrias como los pelos son los encargados de fijar de manera específica ciertas bacterias patógenas a los tejidos.

Transmisión: Las personas contraen la salmonelosis a través del consumo de alimentos contaminados de origen animal, aunque también otros alimentos se han vinculado a la transmisión, incluidas hortalizas contaminadas por estiércol.

También puede transmitirse entre las personas por vía fecal-oral. (OMS, 2013)

e) *Listeria monocytogenes*

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos Gram-positivos cortos, regulares, no esporulados ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas. En cultivos viejos pueden aparecer formando filamentos de 6-20 mm de longitud. Presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 28°C. Las colonias son pequeñas de 1 a 2 mm y lisas. (Mejía Jurado , 2009)

Epidemiología: Las especies de *Listeria* están muy extendidas en el medio ambiente. Se han aislado del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, comida animal, pollo fresco y congelado, alimentos frescos y procesados, queso, leche no procesada, desechos de los mataderos, así como en el tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos. *L. monocytogenes* se ha aislado de variadas especies de mamíferos, aves, peces, crustáceos e insectos. No obstante su principal hábitat es el suelo y la materia vegetal en descomposición, en la cual sobrevive y crece como saprófito. Debido a su amplia distribución, este microorganismo tiene muchas oportunidades de contaminar alimentos en distintos pasos de la producción alimentaria, siendo ésta la vía más frecuente por la que el ser humano adquiere la infección.

La listeriosis puede presentarse esporádicamente o en epidemias; en ambas situaciones, los alimentos contaminados son los principales vehículos de transmisión de *L. monocytogenes*. La leche, el queso, los vegetales frescos, la berza, el pollo, las setas, el pavo y muchos otros suelen ser los alimentos más frecuentemente implicados en ella. (Mejía Jurado , 2009)

Patogenicidad: La patogenicidad de la infección por *L. monocytogenes* aún es poco comprendida y los datos disponibles han derivado de observaciones hechas en animales de experimentación. Los alimentos son la principal ruta de adquisición del patógeno y, por lo tanto, el tracto gastrointestinal es el primer sitio de entrada de *L. monocytogenes* al hospedero. Esta bacteria es capaz de atravesar las tres barreras fisiológicas presentes en los seres humanos: intestinal, hemato-encefálica y placentaria. Al cruzar la barrera intestinal, la bacteria se absorbe desde el lumen intestinal, atravesando las células epiteliales y si el sistema inmune no es capaz de controlar eficientemente la infección, la bacteria seguirá multiplicándose y la infección puede diseminarse al torrente sanguíneo y a los ganglios linfáticos. Tras el ingreso al torrente sanguíneo, la mayoría de las bacterias alcanza el hígado y el bazo, donde puede replicarse en el interior de macrófagos o células epiteliales. Si la replicación de *L. monocytogenes* no es controlada por una efectiva respuesta inmune innata, la bacteria escapa y continúa replicándose.

La sobrevivencia del hospedero depende del desarrollo de una efectiva respuesta inmune adaptativa; de otro modo, la bacteria puede ingresar nuevamente al torrente sanguíneo y alcanzar el cerebro o la placenta, causando infecciones sistémicas potencialmente letales. La capacidad de *L. monocytogenes* para replicarse en el citosol de las células infectadas y diseminarse de célula a célula le permite evitar la respuesta inmune humoral. (Vera & Al., 2013)

Transmisión: La transmisión de la enfermedad infecciosa se produce, principalmente, a través del consumo de alimentos contaminados por *Listeria*, puede deberse al contacto con animales infectados o suelo contaminado. Una transmisión directa de listeriosis de humano a humano también es posible en las personas que han sido infectadas por *Listeria*. Pueden hallarse las bacterias en sus heces durante varias semanas. (Onmeda.es, 2016)

6.4. Análisis de la calidad microbiológica de productos lácteos

Las técnicas microbiológicas en el sector de los alimentos, están dirigidas con mayor frecuencia a la detección de microorganismos indicadores de la posible presencia de patógenos o alterantes, los métodos convencionales de detección de microorganismos como la técnica del NMP, siembra en profundidad o vertido en placa. Los principales objetivos del análisis microbiológico son:

- Asegurar que el alimento cumpla con las normas estatutarias
- Que se ajuste a normas internas establecidas por la empresa que los procesa y a las que exija el comprador
- Que las materias alimenticias que llegan a la planta para ser procesadas cumplan las normas exigidas y pactadas con el productor
- Que se mantenga el control del proceso y la higiene de la línea de fabricación

6.4.1. Métodos convencionales según FDA-BAM

6.4.1.1. Métodos convencionales para la detección de *Escherichia coli*

❖ Número más probable

La determinación de microorganismos coliformes totales por el método del Número más Probable (NMP), se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas al incubarlos a 35°C durante 48 h., utilizando un medio de cultivo que contenga sales biliares.

Esta determinación consta de dos fases:

Fase presuntiva: El medio de cultivo que se utiliza es el caldo lauril sulfato de sodio el cual permite la recuperación de los microorganismos dañados que se encuentren presentes en la muestra y que sean capaces de utilizar a la lactosa como fuente de carbono.

Fase confirmativa: Se utiliza como medio de cultivo el caldo lactosado bilis verde brillante el cual es selectivo y solo permite el desarrollo de aquellos microorganismos capaces de tolerar tanto las sales biliares como el verde brillante. La determinación del número más probable de microorganismos coliformes fecales se realiza a partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva y se fundamenta en la capacidad de las bacterias para fermentar la lactosa y producir gas cuando son incubados a una temperatura de 44.5°C por un periodo de 24 a 48 h.

Finalmente, la búsqueda de *Escherichia coli* se realiza a partir de los tubos positivos de caldo EC, los cuales se siembran por agotamiento en medios selectivos y diferenciales. (UNAM) (Mayaguez). Posteriormente realizando las pruebas bioquímicas básicas a las colonias típicas.

Medios de cultivo y pruebas bioquímicas: Caldo Lauril Sulfato, Caldo EC, TSI, MIO, MR, VP, Citrato.

6.4.1.2. Métodos convencionales para la detección de *Staphylococcus aureus*

La determinación de *Staphylococcus aureus* mediante extensión del inóculo en superficie, es adecuado para el análisis de alimentos en los que se espere encontrar más de 100 células de *Staphylococcus aureus* o 10 células de *Staphylococcus aureus*/ ml de alimento.

❖ Recuento en placas

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento, la técnica comúnmente utilizada es la cuenta en placa. Esta técnica no pretende detectar a todos los microorganismos presentes, pero el medio de cultivo, las condiciones de temperatura y la presencia de oxígeno, permiten seleccionar grupos de bacterias cuya presencia es importante en diferentes alimentos. (Camacho, Giles, Ortegon, Palao, & Serrano, 2009)

Recuento y Siembra en Profundidad: Esta técnica se caracteriza fundamentalmente por la recuperación de células bacterianas viables. Una célula viable se define como la que es capaz de dividirse para dar lugar a descendencia y la forma habitual para llevar a cabo un recuento de este tipo, es determinado por el número de células capaces de generar colonias sobre la superficie de un medio sólido. En esta técnica un volumen no mayor de 1 ml de la dilución apropiada se mezcla con el medio de cultivo fundido. La placa se incuba hasta la aparición de colonias contables.

Recuento y Siembra en Superficie: Este tipo de recuento se define como un procedimiento en el cual cada célula viable puede formar una colonia en placa con agar específico para el microorganismos, donde un cierto volumen de cultivo diluido que no suele ser superior a 0.1 ml, se extiende sobre la superficie de una placa con medio solidó utilizando una asa estéril o escobillón

de vidrio. La placa se incuba en un ambiente predeterminado, hasta que aparecen las colonias y se cuenta su número. (Alonso Nore & Poveda Sanchez, 2008) (Departamento de química)

Medio de cultivo: Agar Baird-Parker.

6.4.1.3. Métodos convencionales para la detección de *Salmonella* spp.

La presencia o ausencia de *Salmonella* spp se determina de forma cualitativa dada su reconocida patogenicidad. Los medios clínicos son de poca aplicación en microbiología de los alimentos, más al tomar en cuenta la posibilidad de que esta bacteria este en bajo número en competencia con otras bacterias y/o disminuida por condiciones desfavorables. El análisis incluye los siguientes pasos:

Pre enriquecimiento: La muestra es enriquecida en un medio nutritivo no selectivo, que permite restaurar las células de *Salmonella* dañadas, logrando de esta manera una condición fisiológica estable.

Enriquecimiento selectivo: Se logra a partir de un medio de cultivo que conjunte dos condiciones, por un lado debe incrementar las poblaciones de *Salmonella* y por otro inhibir otros microorganismos presentes en la muestra.

Selección en medios sólidos: Este punto se deriva directamente del anterior y se utilizan medios selectivos, que restringen el crecimiento de otros géneros diferentes a *Salmonella* y que permitan el reconocimiento visual característico de colonias sospechosas.

Identificación bioquímica: En el cual se da la identificación genérica de los cultivos de *Salmonella* y la eliminación de cultivos sospechosos falsos.

Medios de cultivos y pruebas bioquímicas: XLD, Sulfito de Bismuto, Hektoen, TSI, LIA, Urea, MIO.

6.4.1.4. Métodos convencionales para la detección de *Listeria monocytogenes*.

Se dispone de una variedad de métodos convencionales y rápidos para la detección e identificación de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos y en muestras clínicas procedentes de animales con listeriosis. Los métodos convencionales siguen siendo el “patrón de oro” con el que se comparan los restantes métodos. Habitualmente son muy sensibles. Estos métodos utilizan agentes selectivos y procedimientos de enriquecimiento para reducir el número de microorganismos contaminantes y permitir la multiplicación de *L. monocytogenes*.

Aunque no se necesite con fines reglamentarios, se dispone de diferentes niveles de tipificación de las cepas de *L. monocytogenes*, entre los que se incluyen el serotipado, el fagotipado, la electroforesis de enzimas multilocus, los patrones de digestión del ADN mediante enzimas de restricción, es decir electroforesis convencional o electroforesis en gel de campo pulsado, la tipificación basada en la secuencia de los ácidos nucleicos y la amplificación aleatoria del ADN polimórfico. (OIE, 2004)

Medios de cultivos: Agar Oxford, Caldo LEB, Agar tripticasa de soya con 0,6% de extracto de levadura.

6.4.2. Métodos moleculares para la detección *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*.

En la industria alimentaria es de vital importancia garantizar la ausencia de microorganismos patógenos en el mínimo plazo de tiempo, lo cual ha provocado el desarrollo de metodologías analíticas alternativas, que permitan una detección rápida, económica y fiable.

Estos métodos alternativos para el análisis microbiológico de alimentos ya están siendo empleados tanto por laboratorios de autocontrol como en laboratorios de control oficial de alimentos.

❖ PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente.

La reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. Las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Por su parte, la ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco.

Los avances en la instrumentación e implementación de los descubrimientos de la bioquímica y la biología molecular permiten utilizar la información genética de los microorganismos como: herramientas de identificación y cuantificación de aquéllos de interés para el hombre.

Generalmente, la PCR se lleva a cabo en tres fases:

Desnaturalización: Es la separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 95 y 97 °C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN.

Apareamiento o Hibridación: Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura a 55°C lo que permite la unión o alineamiento de los iniciadores.

Polimerización o Extensión: Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 70 °C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación.

Estas tres etapas: desnaturalización, alineamiento y extensión del ADN, se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias. (Rojas Herrera & Gonzalez Flores, 2006) (Serrato Díaz, Renteria, Aportela Cortez, & Sierra Palacios)

❖ **PCR en tiempo Real.**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real muestra la capacidad de monitorear el progreso de la reacción de PCR a medida que esta ocurre. Es el método más sensible para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos. Aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia.

La emergente tecnología del PCR en tiempo real ha demostrado su versatilidad y utilidad en diversos campos de la investigación biomédica y el diagnóstico biomolecular, siendo la limitante en la imaginación de investigadores y fabricantes de nuevos equipos, productos y servicios asociados a estas ramas del conocimiento. Entre los campos de acción que más recurren a esta tecnología se encuentran la virología, la microbiología clínica y la investigación biomédica, aunque existen otras como las industrias alimenticias y farmacéuticas que han hecho o harán uso de esta tecnología.

Esta técnica combina los pasos de amplificación de ADN y la detección en un único ensayo y evita tener que preparar geles de agarosa para detectar los productos amplificados. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. Los resultados de la PCR en Tiempo Real se visualizan en un gráfico de amplificación, mediante una curva que consta de tres fases: Fase inicial, fase exponencial y fase plateau.

Este sistema utiliza sondas de hidrólisis o sondas taqman, beacon moleculares y sondas FRET (transferidores de energía de resonancia fluorescente).

Sondas de Hidrólisis: Son sondas de hibridación que emplean una sonda con secuencia específica de oligonucleótidos y dos secuencias de primers específicas. La sonda está diseñada para que se una a las secuencia diana. La sonda lleva un colorante donador en su extremo 5' y un colorante aceptor en su extremo 3'. El donante y el receptor de los fluoróforos se seleccionan de manera que el espectro de emisión del fluoróforo donador se traslape de forma significativa con el espectro de excitación del fluoróforo receptor, mientras que el espectro de emisión del fluoróforo del donante es espectralmente separado del espectro de emisión del fluoróforo aceptor.

La excitación se realiza en una longitud de onda específica para el fluoróforo del donante, y la reacción se controla con la emisión de longitud de onda del fluoróforo aceptor. Durante la etapa de hibridación del PCR en tiempo real, las sondas se hibridan con sus secuencias dianas.

TaqMan: Emplean una secuencia específica, sondas de oligonucleótidos marcadas fluorescentemente llamadas sondas TaqMan, agregadas a la secuencia específica del primer. También conocidos como ensayos nucleasa-5', el ensayo TaqMan utiliza la actividad de la exonucleasa 5' de ciertas polimerasas termoestables, como la Taq. La sonda contiene un reportero fluorescente unido al extremo 5' y un apagador unido al extremo 3'. Cuando se juntan la fluorescencia del reportero es apagada debido a la proximidad con el apagador.

Durante los pasos de hibridación y extensión de la reacción de amplificación, la sonda hibrida la secuencia y la actividad de la exonucleasa 5' → 3' de la Taq específica del ADNds separa al reportero. Como resultado, el reportero es separado de su apagador, y la señal de fluorescencia resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado en la muestra.

Beacons moleculares: Emplea un par de primers específicos y una sonda que contiene una secuencia específica que reconoce la secuencia diana, en el extremo 5' de la sonda está el fluoróforo y en extremo 3' el apagador. En ambos extremos de la sonda hay secuencias complementarias (5 nt) que al unirse forman un horquilla, que mantiene apagada la fluorescencia. Cuando la sonda encuentra su secuencia diana la horquilla se abre y el reportero al separarse del apagador emite fluorescencia. La secuencia diana del Beacon está diseñado para hibridar específicamente la sección de 15 – 30 nt de la secuencia blanco.

FRET (transferidores de energía de resonancia fluorescente): Los FRET requieren de dos moléculas que pueden interactuar entre sí, por lo menos uno de los cuales puede ser capaz producir fluorescencia. El componente fluorescente se llama donante y la segunda molécula se llama aceptor. Durante el FRET, el colorante fluorescente donante es excitado por una fuente de energía externa de luz en ó cerca de su longitud de onda de excitación óptima y entonces emite una luz en un cambio mayor de longitud de onda “cambio de Stoke”.

En lugar de ser detectado por el instrumento, la luz emitida se utiliza para excitar a la molécula aceptora, que está en estrecha proximidad física. La molécula aceptora absorbe la energía de luz emitida por el donante fluorescente, apagando eficientemente la señal del donador.

La longitud de onda emitida por la molécula donante debe estar cerca del máximo de absorción de la molécula aceptora. La molécula aceptora puede o no emitir luz. Si la luz es emitida por el aceptor, el cambio será mayor así como la longitud de onda, que aquella emitida por el donante. La señal del aceptor será detectada por el instrumento en tiempo real, pero no se registrará como una señal de reportero por el software. Los FRET dependen de que las moléculas del donante y del aceptor estén de 10 – 100 Å y disminuye con el aumento de la distancia.

- **Interpretación de resultados de la PCR Tiempo Real**

Fluorescencia de fondo: Esta es ajustada para distinguir señales de amplificaciones relevantes del fondo.

Valor Umbral (Ct): El Ct es el número de ciclos donde la señal de fluorescencia de la reacción cruza el umbral. El Ct es utilizado para calcular el número de copias inicial de ADN, ya que el valor de Ct es inversamente proporcional a la cantidad inicial de producto.

Fase inicial o línea basal: La línea base en la reacción del PCR en tiempo real se refiere al nivel de señal durante los ciclos iniciales del PCR en tiempo real, usualmente de 3 a 15 ciclos, en los cuales hay pequeños cambios en la señal de la fluorescencia. El nivel bajo de señal de una línea base puede ser comparado al fondo o al “ruido” de la reacción.

La línea base en un PCR en tiempo real es determinado empíricamente para cada reacción, utilizando manuales teóricos ó análisis automatizados de la marca de ampliación. La línea base puede ser ajustada cuidadosamente para permitir una determinación precisa del Ct, definido posteriormente.

Fase Exponencial: En el PCR en tiempo real es mejor cuantificar los productos de la amplificación al inicio de la fase exponencial ó al final, cuando la curva busca el Plateau. Al inicio de la fase exponencial, todos los reactivos están en exceso, la ADN polimerasa está altamente eficiente, y el producto que está presente en bajas cantidades no competirá con la capacidad de hibridación de los *primers*.

Fase Plateau: En esta fase finaliza la reacción y se estabiliza la fluorescencia.

6.5. Condiciones Higiénico-sanitarias

La calidad higiénico-sanitaria son las características que debe cumplir un producto alimentario para asegurar que su consumo no implica un riesgo de salud para el consumidor.

La contaminación en los alimentos se da cuando se transfieren bacterias o microorganismos patógenos, haciendo que éstos no sean aptos para el consumo humano

Los principales puntos de control en la elaboración de productos lácteos son:

Materia prima: El control de las materias primas es fundamental para eliminar los peligros microbiológicos, químicos y físicos, cuya eliminación no puede ser garantizada por ninguna etapa posterior del proceso al ser en general sustancias o microorganismos resistentes a las altas temperaturas. Pero esta etapa, a su vez, también es muy importante para garantizar la eficacia de los tratamientos térmicos posteriores frente a los peligros biológicos.

Agua: El agua empleada en una industria alimentaria puede suponer una fuente importante de contaminación, dando origen a problemas no sólo sanitarios, sino también tecnológicos. El origen del agua puede ser de la red de abastecimiento público, captación propia o ambas procedencias. Dependiendo del origen se realizará el plan de control y tratamiento adecuado, para disponer de agua potable en cada etapa de producción.

Los puntos de muestreo para el autocontrol del agua de la industria alimentaria serán determinados por ella, junto con la supervisión de la autoridad sanitaria. Estos puntos son aquellos en los que el suministro puede tener incidencia directa en la seguridad de los productos alimenticios elaborados. Las industrias alimentarias con abastecimiento propio y las conectadas a una red de abastecimiento con depósito intermedio, deberán realizar las analíticas del agua, según el tipo de abastecimiento

Manipuladores: Los manipuladores son una de las principales fuentes de contaminación de los alimentos, para reducir la posibilidad de que un manipulador contamine un alimento, éstos han de tener una formación acorde al puesto de trabajo que desempeñan. Por lo tanto deberán contar con: Sentido del control higiénico en toda la cadena alimentaria y conocimiento sobre la correcta limpieza y desinfección de útiles e instalaciones.

Las manos carentes de aseo es uno de los principales factores que favorecen la contaminación por determinados microorganismos , como medidas correctoras ante evidencias de malas prácticas de higiene por parte de algún manipulador, se considerará la inclusión de modificaciones en el plan de formación con la actualización de conocimientos de forma continuada.

Utensilios: Todos los materiales que tengan un contacto con las distintas materias primas y con el producto final, ya sean depósitos, cubas, moldes, prensas, cintas transportadoras, bandejas, envases finales, etc., han de ser de unas características tales que no alteren el producto. En la actualidad, la mayoría de los equipos son de acero inoxidable y materiales sintéticos, debido a la modernización de las industrias, que han actualizado sus equipos y procesos. Este material facilita en gran medida las operaciones de limpieza y desinfección, al tiempo que incrementa la vida útil del equipo o superficie. (CECAM, s.f)

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de Estudio: Descriptivo, prospectivo de corte transversal.

Tipo de muestreo: No probabilístico por conveniencia.

Área de Estudio: El estudio se realizó en las áreas de procesamiento de la finca San Diego, del Municipio de Cuapa, Chontales.

Universo: El universo estuvo conformado por todos los productos lácteos, materia prima, manipuladores y utensilios utilizados en el proceso de elaboración en la finca San Diego, del Municipio de Cuapa, Chontales, Noviembre-Diciembre 2016.

Muestras: Las muestras estuvieron conformadas por: 4 muestras de productos (20 submuestras) y 15 muestras tomadas en los procesos de elaboración.

- ❖ 1 lote de leche cruda como materia prima, constituida por 5 submuestras.
- ❖ 3 Productos lácteos conformados por queso fresco, quesillo y cuajada; de los cuales se tomó 1 lote por cada una de las muestras y 5 submuestras según la Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense para los Quesos (NTON-03-065-06).
- ❖ 3 Muestras de agua (2 de grifo y 1 de pozo)
- ❖ 4 Utensilios (mesa, cuchillo, molino, tina)
- ❖ 4 Manipuladores
- ❖ 4 Ordeñadores

Criterios de Inclusión:

- El producto lácteo sea elaborado en la fecha establecida en la finca San Diego.
- El producto lácteo esté en condiciones óptimas para la toma de muestra.

Criterios de Exclusión:

- El producto lácteo este próximo a caducar.
- El producto lácteo que no sea de interés investigativo.

Redacción de la información: El procesamiento de los datos se realizó de forma computarizada por el software Microsoft Word y Excel. El análisis de la información se hizo por medio del cálculo porcentajes para dar a conocer los resultados de las variables de estudio.

Para la elaboración del documento se usaron los programas Microsoft Word para procesar los textos y Microsoft Excel para la elaboración de las tablas y gráficos, Microsoft Power Point para el diseño de la presentación. Los datos fueron tabulados y presentados en tablas y gráficos de distribución de frecuencias.

Consideraciones éticas: Antes de dar inicio con la investigación, se hizo contacto directo con el propietario de la finca San Diego, del Municipio de Cuapa, Chontales, en el que se solicitó su autorización y colaboración en cada parte del proceso investigativo; a la vez se le dio a conocer el propósito del estudio.

Procedimientos: Una vez con la autorización del propietario de la finca y de la dirección del laboratorio del CNDR, se procedió con las siguientes actividades:

a) Toma de muestras

Se tomaron muestras de queso fresco, cuajada y quesillo con peso de 1 libra por cada uno y 1,000 ml de leche cruda y se transportaron en cadena de frío en un termo con refrigerantes al CNDR-MINSA donde se procesaron dichas muestras. Se utilizó la técnica recomendada por la FDA-BAM para productos lácteos.

Hisopado de manos y superficies:

Material: Tubos con tapa a rosca que contengan 2- 3 ml de agua peptonada buffer fosfato y solución Ringer, e hisopos de algodón esterilizados.

Manos:

- ❖ Se humedeció el hisopo en el diluyente y se lavó la superficie de la palma de la mano haciendo rotar el hisopo.
- ❖ Se lavó el hisopo en el diluyente y se escurrió contra la pared del tubo.
- ❖ Se repitió la misma operación lavando otros dedos y entre las uñas y se quebró el hisopo dejando la punta del algodón en el tubo.
- ❖ Repitiendo la operación con la otra mano. Ambos hisopos se colocaron en el mismo tubo.
- ❖ Una vez tomada la muestra se procedió a realizar las siembras por el método de NMP.

Superficies:

- ❖ Si la superficie estaba seca, se humedece el hisopo en la solución buffer, en caso de que la superficie este húmeda, no es necesario hacer esta operación.
- ❖ Con el hisopo inclinado en un ángulo aproximado de 30° frotando 3 veces, cada una en dirección opuesta (en sentido vertical, horizontal y diagonal, aplicando la mayor presión posible) sobre una superficie aproximada de 50 cm².
- ❖ Se enjuaga el hisopo en la solución buffer, regresando el exceso de líquido y repitiendo la operación con el mismo hisopo sobre tres porciones más de la misma superficie, de 50 cm² cada una, para a completar un área de 200 cm².
- ❖ Regresando el hisopo al tubo y rompiendo la parte que estuvo en contacto con los dedos.
- ❖ Una vez tomada la muestra se procedió a realizar las siembras.

b) Transporte y almacenamiento de las muestras

En las prácticas de transporte y almacenamiento de muestras se mantuvieron las condiciones de almacenamiento recomendadas para el producto lácteo. El análisis de la muestra se inició tan pronto como fue posible tras la recepción de la muestra. Una vez tomadas las muestras se colocaron en cadena de frío para ser transportadas hasta el laboratorio. Luego de ser procesadas se almacenaron las muestras a una temperatura de $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

c) Aislamiento para coliformes totales y fecales

Número más probable- Presuntiva

- ❖ En un frasco con 450 ml de agua peptonada alcalina, se pesó 50 g de muestra y se mezcló durante 1 minuto.
- ❖ Se prepararon diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y otros según corresponda, transfiriéndose 1 ml de dilución anterior a 9 ml de APA.
- ❖ Se usaron al menos 3 diluciones consecutivas, se inocularon alícuotas de 1 ml de cada dilución en 3 tubos de Lauril triptosa simple.
- ❖ Se incubaron los tubos de Lauril triptosa a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
- ❖ Se examinaron los tubos y registrar las reacciones de gas a las $24/48 \pm 3$ h.
- ❖ Se realizó la prueba confirmativa en todos los tubos positivos presuntivos.

Confirmación para coliformes

- ❖ De cada Lauril triptosa simple con gas se realizó la transferencia con un asa de siembra de la suspensión a un tubo de caldo de bilis verde brillante.
- ❖ Se incubaron los tubos a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y se comprobó la producción de gas a 48 ± 3 h.
- ❖ Se calculó número más probable de coliformes basado en la proporción de tubos de lauril triptosa con gas confirmados por 3 diluciones consecutivas.

Confirmación para coliformes fecales y *E. coli*

- ❖ De cada lauril triptosa con gas se realizó la transferencia con un asa de siembra de la suspensión a un tubo de caldo de EC.
- ❖ Se incubaron los tubos de caldo EC un periodo de 24 ± 2 horas a $45,5^{\circ}\text{C}$ y se examinó la producción de gas. Si era negativo, se reincubó y examinó de nuevo a los 48 ± 2 h.
- ❖ Si era positivo se incubó los tubos en caldo E.C + MUG por 24 horas a 35°C . Se examinó la turbidez en tubo y se comprobó la positividad con lámpara de fluorescencia.

d) Aislamiento de *Staphylococcus aureus*

Recuento en placas

- ❖ Se pesaron 25 g de muestra en 225 ml de Agua peptonada buferada.
- ❖ Se prepararon diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y otros según corresponda, transfiriéndose 1 ml de dilución anterior a 9 ml de APA.
- ❖ Por cada dilución se transfirió asépticamente 1 ml de suspensión de 3 placas de agar Baird Parker.
- ❖ Se difundió el inóculo sobre la superficie de la placa de agar, utilizando varilla de vidrio estéril.
- ❖ Conservando las placas en posición vertical hasta que el inóculo fue absorbido por el agar.
- ❖ Por último, se invirtió las placas e incubó a 45-48 horas a 35-37°C.

Prueba de coagulasa

- ❖ Fueron agregadas las colonias sospechosas de *S. aureus* en tubos pequeños con 0,3 ml de caldo BHI y emulsionándose a fondo.
- ❖ Se incubó la suspensión de caldo BHI de 2 a 4 horas a 35-37°C.
- ❖ Luego se añadió 0,3 ml de plasma reconstituido con EDTA al caldo BHI y se mezcló bien.
- ❖ Por último, la suspensión fue incubada a 35-37°C y comprobando periódicamente durante cada 2 horas la formación del coágulo.

e) Aislamiento de *Salmonella spp*

- ❖ Se pesaron 25 gramos de la muestra y añadieron 250 ml de agua tamponada y se mezcló.
- ❖ Transfiriendo 0.1 ml de la mezcla a 10 ml de medio Rappaport-Vassiliadis
- ❖ Se incubó el medio Rappaport-Vassiliadis (RV) 24 ± 2 horas a $42 \pm 0,2$ ° C en baño maría.
- ❖ Se vortió cada tubo y se inoculó la muestra con el asa de los caldos que se incubaron, en sulfito de bismuto (BS), agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), y Hektoen entérica (HE).
- ❖ Se incubaron las placas 24 ± 2 horas a 35 ° C. Se examinaron las placas para presencia de colonias de *Salmonella spp*, que pueden ser:

Agar Hektoen Entérica (HE): Azul-verde a colonias azules con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con centros negros grandes, brillantes o pueden aparecer como colonias casi completamente negras.

Desoxicolato xilosa lisina agar (XLD): Colonias de color rosa con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella* pueden producir colonias con centros negros grandes, brillantes o pueden aparecer como colonias casi completamente negras.

Sulfito de bismuto (BS) agar: Marrón, gris, negro o colonias; a veces tienen un brillo metálico. Medio circundante es generalmente de color marrón al principio, pero puede aparecer en negro en el tiempo con el aumento de la incubación, produciendo el llamado efecto de halo.

f) Aislamiento de *Listeria monocytogenes*

- ❖ Se inocularon 50 g o ml de muestra en 450 ml de caldo de enriquecimiento para *Listeria* (LEB).
- ❖ Se incubó el caldo a 30°C durante 48 horas.
- ❖ Se extendió 0,1 ml de cultivo con caldo para enriquecimiento sobre placas con agar de Oxford y se incubaron las placas a 37°C.
- ❖ Se observó el crecimiento de bacterias transcurridas 24 y 48 horas. (Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2008)

Agar Oxford: Las colonias de *Listeria* son de aproximadamente 1 mm de diámetro colonias negras rodeadas por un halo de color negro y el centro hundido.

g) Método de Extracción: Dynabeads® DNA DIRECT™ Universal Kit

1. Se tomó la muestra previamente incubada con APB (*Salmonella*) o Caldo LEB (*Listeria monocytogenes*).
2. Se colocó la muestra en un vial estéril y se centrifugó a 15.000 × g durante 5 min.
3. Descartándose el sobrenadante y añadiendo 200 µL de Dynabeads® en una sola acción rápida de pipeteo.
4. Dejando el tubo a temperatura ambiente durante 5 min.
5. Se colocó el tubo en el DynaMag™-2 durante 2 min.
6. Eliminando y descartando el sobrenadante.
7. Se retiró el tubo del imán. Añadiendo 200 µl 1× de la solución de lavado.
8. Colocando el tubo en el DynaMag™-2 y dejándolo 30 segundos o hasta que el sobrenadante se haya despejado.

9. Se retiró con cuidado y se desechó el sobrenadante.
10. Repitiendo los pasos 7 y 8 una vez más.
11. Se retiró el tubo del DynaMag™ -2.
12. Se resuspendió el Complejo DNA / Dynabeads® en 20-40 µL de solución de resuspensión.
Pipeteando el complejo arriba y abajo 30-40 veces o hasta que la suspensión sea homogénea.
13. Se colocó inmediatamente el tubo en el DynaMag™ -2 y se dejó durante 30 segundos.
Transfiriendo el sobrenadante que contiene ADN, a un nuevo vial estéril.

h) PCR Tiempo Real

1. Se preparó el equipo Applied BioSystems, programándose las condiciones de amplificación
2. Se realizó la preparación de la Master Mix con el kit FastStart Universal Probe Master Applied Biosystem
3. Realizando la preparación de la curva de calibración y controles
4. Se colocaron 9 uL de la Master Mix y 1 uL del ADN en la placa para la PCR
5. Se situó la placa en el equipo e inicio la corrida.
6. Esperando la amplificación del fragmento del ADN de interés y realizando el ajuste de la curva de calibración y obtención de datos.

VIII. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Subvariable	Indicador	Valores	Criterios
Métodos convencionales para el aislamiento de <i>E.coli</i>	Número más probable (NMP)	Caldo Lauril Sulfato	Presencia de gas en la campana de Durham y turbidez en el caldo	Positivo
			Ausencia de gas en la campana de Durham y no hay turbidez	Negativo
		Caldo EC	Producción de gas	Positivo
			No hay producción de gas	Negativo
	Pruebas Bioquímicas	TSI	<u>Superficie:</u> Fermentación de lactosa y sacarosa <u>Profundidad:</u> Fermentación de glucosa con producción de gas	A/AG
			<u>Superficie:</u> No hay fermentación de lactosa y sacarosa <u>Profundidad:</u> No hay fermentación de la glucosa	K/K
			<u>Superficie:</u> No hay fermentación de la lactosa y sacarosa <u>Profundidad:</u> Fermentación de glucosa con producción de gas y sulfuro de hidrogeno	A/KG+
		MIO	Movilidad	Turbidez: Positiva No hay turbidez: Negativa
			Indol	Anillo rosado: Positivo Anillo amarillo: Negativo
			Ornitina	Intensifica el color violeta: Positivo

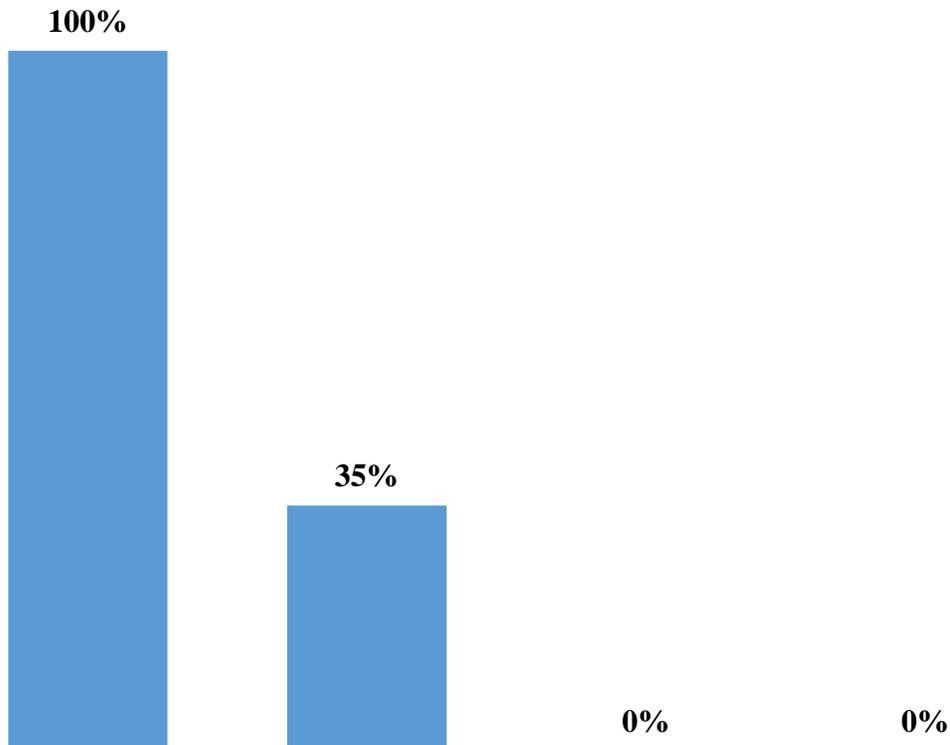
				Viraje al color amarillo: Negativo
		MR	Anillo color rojo	Positivo
			Anillo color amarillo	Negativo
		VP	Anillo color zapote	Positivo
			Anillo amarillo o transparente	Negativo
		Citrato	Viraje al color azul	Positivo
			No hay viraje de color	Negativo
Métodos convencionales para el aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	Recuento en placa	Agar Baird-Parker	Colonias grises o negro azabache rodeadas de una zona clara externa	Crecimiento característico de UFC No hubo crecimiento bacteriano
		XLD	Colonias rojas con centro negro	Crecimiento característico de UFC No hubo crecimiento bacteriano
	Aislamiento de <i>Salmonella spp</i>	Sulfito Bismuto	Colonias marrones o negras con o sin brillo metálico	Crecimiento característico de UFC No hubo crecimiento bacteriano
		Hektoen	Colonias verdes azuladas	Crecimiento característico de UFC No hubo crecimiento bacteriano
Métodos convencionales para el aislamiento de <i>Salmonella spp</i>	Pruebas Bioquímicas		<u>Superficie:</u> Fermentación de lactosa y sacarosa <u>Profundidad:</u> Fermentación de glucosa con producción de gas	A/AG
		TSI	<u>Superficie:</u> No hay fermentación de lactosa y sacarosa <u>Profundidad:</u> No hay fermentación de la glucosa	K/K

			<u>Superficie:</u> No hay fermentación de la lactosa y sacarosa <u>Profundidad:</u> Fermentación de glucosa con producción de gas y sulfuro de hidrogeno	A/KG+
		LIA	<u>Superficie:</u> Desaminación de la lisina negativa <u>Profundidad:</u> Descarboxilación de la lisina positiva con poca producción de gas	K/Kg
			<u>Superficie:</u> Desaminación de la lisina negativa <u>Profundidad:</u> Descarboxilación de la lisina negativa, sin gas y sin H ₂ S	K/A
			<u>Superficie:</u> Desaminación de la lisina positiva <u>Profundidad:</u> Descarboxilación de la lisina negativa con poco gas y H ₂ S	R/Ag+
		UREA	Viraje de color a rosado intenso	Positiva
			No hay viraje de color	Negativa
		MIO	Movilidad	Turbidez: Positiva No hay turbidez: Negativa
			Indol	Anillo rosado: Positivo Anillo amarillo: Negativo
			Ornitina	Intensifica el color violeta: Positivo Viraje al color amarillo: Negativo

Métodos convencionales	Aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	Agar Oxford	Colonias negras rodeadas por un halo de color negro	Crecimiento característico de UFC No hubo crecimiento bacteriano
PCR en tiempo real	<i>Salmonella</i> spp y <i>Listeria monocytogenes</i>	Extracción y amplificación de un fragmento de ADN	Curva de amplificación	Positivo
				Negativo
Condiciones higiénico-sanitarias	NMP en muestras de Agua	Caldo Lauril Concentrado	Presencia de gas en la campana de Durham y turbidez en el caldo	Positivo
			Ausencia de gas en la campana de Durham y no hay turbidez	Negativo
		Caldo Bilis Verde brillante	Producción de gas	Positivo
			No hay producción de gas	Negativo
		Caldo EC	Producción de gas	Positivo
			No hay producción de gas	Negativo
	EC Mug	Fluorescencia	Positivo	
		Ausencia de fluorescencia	Negativo	
	Hisopado de manos en Ordeñadores y manipuladores	Agua peptonada	_____	_____
		Caldo Bilis Verde brillante	Producción de gas	Positivo
			No hay producción de gas	Negativo
		Caldo EC	Producción de gas	Positivo
			No hay producción de gas	Negativo
		EC Mug	Fluorescencia	Positivo
	Ausencia de fluorescencia		Negativo	
	Hisopado de utensilios	Agua peptonada	_____	_____
		Caldo Bilis Verde brillante	Producción de gas	Positivo
			No hay producción de gas	Negativo
Caldo EC		Producción de gas	Positivo	
		No hay producción de gas	Negativo	
EC Mug		Fluorescencia	Positivo	
	Ausencia de fluorescencia	Negativo		

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gráfico 1. Presencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* por métodos convencionales según FDA-BAM.



Los métodos convencionales son importantes, ya que su empleo permite obtener microorganismos en cultivos puros, además siguen siendo los métodos de referencia frente a los que se comparan y validan otros métodos, normalmente son muy sensibles y de bajo costo. Mediante los métodos convencionales según FDA-BAM, se analizaron cuatro lotes conformados por cinco muestras cada uno, de las cuales un 100% fueron positivas para *Escherichia coli*, y un 35% para *Staphylococcus aureus*, superando el rango máximo permitido según, la norma nicaragüense NTON-03-065-06 (ver anexos) que establece 10^3 UFC/cm³ para *Staphylococcus aureus*, y 0 UFC/cm³ para *Escherichia coli*.

En comparación con un estudio realizado en Chile en 1999 por Romero, donde caracterizó microbiológicamente quesos elaborados por pequeños productores de leche, obtuvo como resultado un 6 % de muestras positivas para *Staphylococcus aureus*; esto puede deberse a que el número de *S. aureus* decrece dependiendo de la concentración de sal, de la actividad del cultivo láctico y del tiempo de maduración, ya que estos microorganismos tienden a disminuir durante ese periodo; por el contrario *Escherichia coli*, estuvo presente en el 90% de las muestras, este valor puede atribuirse a factores como la carga bacteriana inicial, tiempo de maduración y a las condiciones higiénicas mantenidas en la elaboración y almacenamiento de los quesos, siendo estos datos obtenidos similares a los del presente estudio.

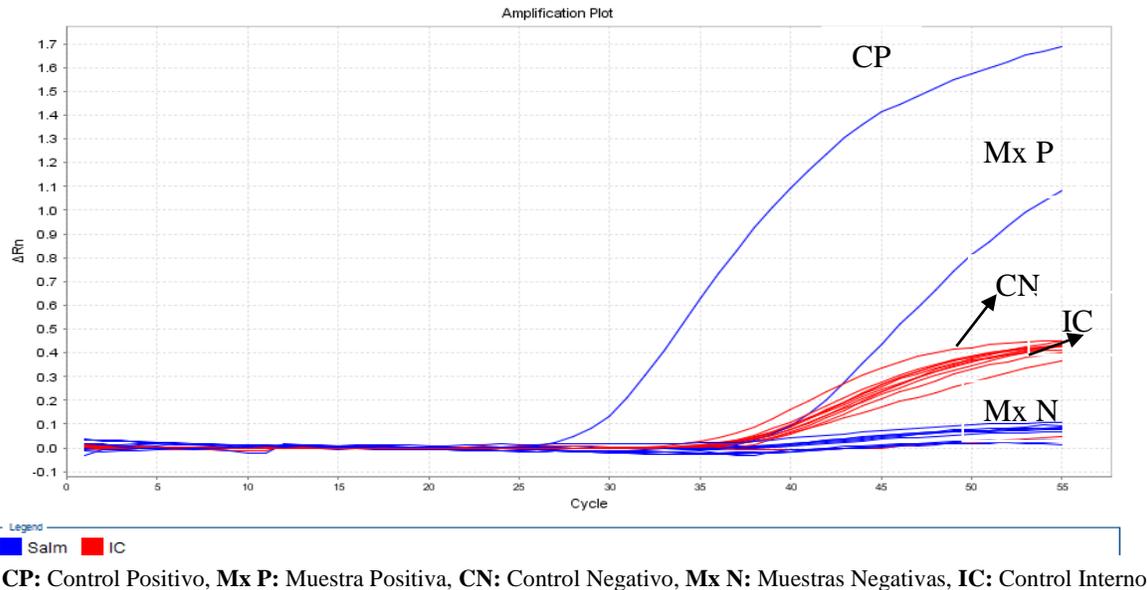
Sin embargo en un estudio realizado por Delgado et al., en el 2001 en Lima, Perú, demostró la presencia de *Escherichia coli* en un 28,1% y *Staphylococcus aureus* en un 87,2% de un total de 39 muestras de quesos analizadas, reflejando lo difícil que se hace establecer comparaciones entre estos parámetros por los diferentes factores que implica su elaboración. Esto se relaciona específicamente por la elevada carga microbiana en las muestras de lácteos, lo que indica deficiencias higiénicas en la manipulación de los productos terminados, debido a que la materia prima “leche cruda” presento en ambos estudios una baja carga microbiana en comparación con los productos.

En Nicaragua, en el año 2015 Alemán et al., realizaron un estudio para el aislamiento y detección de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales, obteniendo como resultado ausencia de *Listeria monocytogenes* en 100 muestras analizadas; siendo similar a los resultados obtenidos en el presente estudio. Confirmando lo que Espinoza et al., plantearon en el año 2003 sobre los factores que influyen en la ausencia de esta bacteria en los productos los cuales pueden ser: la exposición al aire libre, irradiación solar casi directa, ocasionando pérdida de humedad y endurecimiento del producto, condición donde la probabilidad de encontrar este microorganismo es casi nula.

En cambio Schobitz et al., en el año 2001, en Chile; determinaron la presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y queso fresco en 75 muestras correspondientes a 50 muestras de leche y 25 de queso, con resultados de un 22% en el análisis de leche y ausencia en quesos.

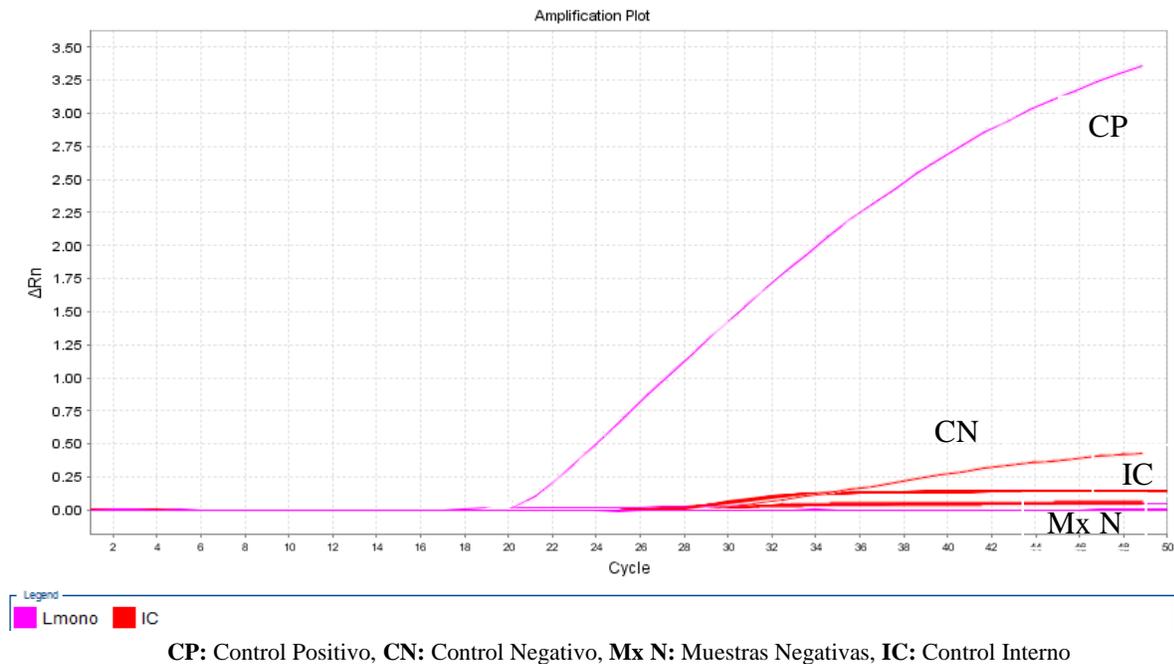
Resultando estos datos diferentes de los obtenidos en nuestro estudio, en el que no se detectó *Listeria monocytogenes* en leche cruda y productos lácteos, no constituyendo por lo tanto un peligro potencial para el consumidor. Sin embargo la presencia del patógeno demuestra la ubicuidad y capacidad para multiplicarse a bajas temperaturas; originándose la contaminación de la leche a través de la alimentación de las vacas con ensilaje del patógeno en el ambiente del lugar de ordeño o sobre la superficie de los tanques de recepción de leche, entre otros factores. (Fenlon, 1989)

De igual manera hubo ausencia en los resultados obtenidos para *Salmonella spp*, en el presente estudio; a diferencia de Plaza et al., que realizaron un estudio en Guayaquil, Ecuador en el 2011, donde analizaron 120 muestras de quesos y obtuvieron un 13.71% de muestras positivas para *Salmonella spp* por métodos convencionales. La presencia de este, fue debido a las condiciones propias de los quesos, como: pH ácido, humedad y bajo porcentaje de sal, los cuales crean un ambiente propicio para la proliferación de la misma. Siendo de particular importancia la determinación de este patógeno que atenta directamente con la salud de los consumidores. Así mismo Leyer y Jhonson demostraron la habilidad de la *Salmonella* para adaptarse en ambientes ácidos, lo que constituye un importante mecanismo de supervivencia que las capacita para persistir en productos lácteos fermentados y posiblemente en otros alimentos ácidos. (Leyer, 1992)

Gráfico 2. Detección de *Salmonella spp* por PCR Tiempo Real.

La PCR en Tiempo Real, ha sido utilizada para la detección de patógenos de origen alimentario, este proceso es efectivo debido a su sensibilidad, especificidad y detección temprana. Del total de 20 muestras analizadas por este método molecular, un 5% que correspondió a una muestra fue positiva para *Salmonella spp*, resultando esta muestra relevante debido a que esta técnica posee una mayor sensibilidad que los métodos convencionales, obteniendo una positividad a muy bajas concentraciones, como se visualiza en el gráfico 2, donde se puede apreciar la muestra positiva que inició su amplificación en el ciclo 38, validándose con el control positivo que inició su amplificación en el ciclo 27, considerándose siempre la posibilidad de encontrar ADN bacteriano de células muertas, viables o no viables para su multiplicación.

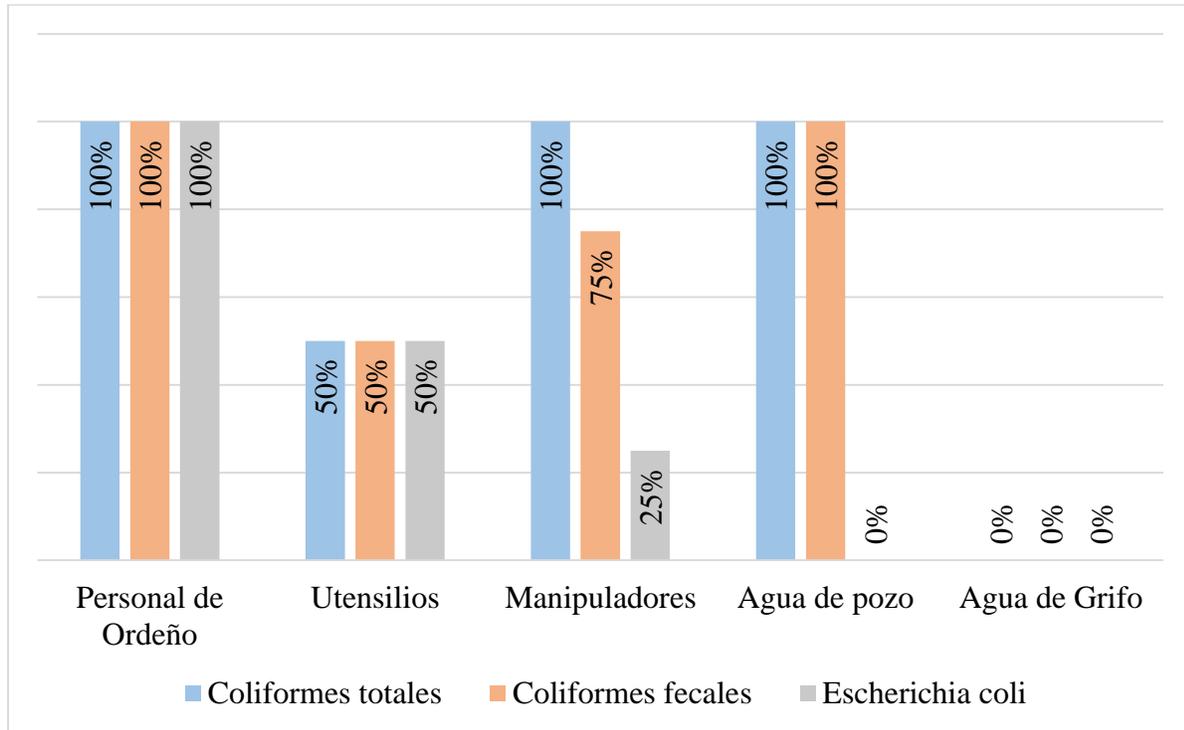
En un estudio realizado en México por Alcázar et al., en el 2006; donde analizaron 120 muestras de queso por la PCR Tiempo Real solo tres muestras (2.5%) fueron positivas para *Salmonella spp*, siendo comparable al presentado en este estudio. (Alcazar, 2006). A diferencia de un estudio realizado por Colorado en 2014 en Veracruz donde obtuvo un 14.2% de muestras positivas para *Salmonella spp.*, correspondiente a 17 muestras de un total de 120; resaltando el alto riesgo que representan los quesos artesanales para contraer esta bacteria, debido a su elaboración que se realiza con leche cruda y de igual manera por la falta de higiene durante el proceso relacionándose con los altos niveles de contaminación.

Gráfico 3. Detección de *Listeria monocytogenes* por PCR Tiempo Real.

Las muestras obtenidas también fueron analizadas por la PCR Tiempo Real para la detección de *Listeria monocytogenes*, encontrándose ausencia de este patógeno, como se visualiza en el gráfico 3, donde se puede apreciar que las curvas tienen tendencia negativa y no presentan amplificación; el control positivo cuyo *Crossing point* (CP) se empezó a amplificar en el ciclo 20 mostrando una curva diferente a las demás muestras, resultados similares a los obtenidos por Alemán et al., en Nicaragua en el año 2014. Donde se analizaron un total de 100 muestras de quesos para *Listeria monocytogenes* obteniendo ausencia de la misma, corroborando de esta manera que en nuestro país no prevalece esta bacteria, por lo que se consideran datos satisfactorios.

Camacho et al., en el 2007 afirmaron que un factor que afecta el crecimiento de *Listeria spp.*, es la competencia que se da con microorganismos propios de la leche y otros patógenos que hacen más difícil su supervivencia, debido a que debe competir por nutrientes con otras especies con un tiempo de duplicación más corto como las coliformes o bacterias ácido lácticas, estas últimas se alimentan de lactosa provocando su rápido crecimiento y acidificando la leche rápidamente (Camacho A. S., 2007).

La ausencia de *Listeria spp* se puede deber a varios factores como la composición del suelo, alimentación del ganado, condición ambiental, higiene del ordeño y comportamiento bacteriano. En cambio Ramírez et al., en el 2010 realizó en Venezuela un estudio para 30 muestras de queso blanco por PCR, obtuvo dos muestras positivas para *Listeria monocytogenes* quienes sugieren que el crecimiento de esta bacteria es de distribución amplia en la naturaleza, a causa de su resistencia a condiciones extremas de temperatura, acidez, salinidad y su capacidad para multiplicarse a bajas temperaturas; además de ser responsable de la listeriosis humana transmitida por alimentos y se ha convertido en un importante problema para la salud pública. (Ramirez, 2010)

Gráfico 4. Condiciones higiénico-sanitarias en las que se elaboran los productos lácteos artesanales

La implementación de las condiciones higiénico-sanitarias por la industria láctea es importante para asegurar la inocuidad del producto. Por lo tanto se realizó la evaluación microbiológica de los factores que pueden influir en la contaminación del producto en diferentes puntos del proceso de elaboración. Se analizaron un total de 15 muestras que correspondieron a: Dos muestras de agua (pozo y grifo), cuatro hisopados de manos del personal del ordeño, cuatro de los manipuladores de los productos y cuatro muestras de los utensilios. Obteniendo como resultado que el agua de grifo es la única muestra que cumplió con los criterios de aceptación. En las muestras de utensilios se obtuvo un 50% (2/4) de Coliformes Totales, Fecales y *Escherichia coli*. De la misma manera en la muestra de agua de pozo se encontró una positividad del 100% para Coliformes Totales y Fecales. A diferencia de un estudio realizado por Romero en el año 2015 en Colombia, sobre la evaluación microbiológica del proceso de elaboración del queso, donde analizaron 25 muestras de superficies, las cuales presentaron una positividad de: 11% coliformes totales, 7% coliformes fecales y en un 2% *E. coli*. (Romero L. , 2015).

La presencia de estos microorganismos en las superficies contaminadas se debe a que la empresa presenta defectos en la infraestructura como grietas, distribuciones de áreas de trabajo y pozos cerca del área de ordeño, dificultando el acceso a procesos de limpieza y desinfección, convirtiéndose en ser más propenso a permanecer con la suciedad, por ende es uno de los reservorios de microorganismos debido a la cantidad de sitios de retención de materia orgánica e inorgánica. (Taylor, 1998)

Cabe recalcar que el proceso de molido de la cuajada se realiza en un molino público ya que la microempresa no cuenta con uno propio, siendo este uno de los principales focos de contaminación en el proceso, ya que la limpieza del mismo no se lleva a cabo de una manera correcta, solamente se utiliza agua del grifo sin ninguna solución desinfectante.

Los manipuladores de alimentos desempeñan un papel importante en la prevención de intoxicaciones alimentarias y de otras enfermedades transmitidas por los alimentos, la presencia de un 100 % de Coliformes Totales, Fecales y *Escherichia coli* en las muestras del personal de ordeño, y un 100 % para Coliformes Totales, 75% Coliformes Fecales y un 25% de *Escherichia coli* en muestras de manipuladores, se debe a deficientes procesos de limpieza, desinfección, falta de educación o formación de los mismos. La formación de los manipuladores es un factor fundamental para alcanzar la seguridad alimentaria que se pretende, por ello conviene que las pequeñas empresas se esfuercen en proporcionar a sus operarios conocimientos básicos de higiene alimentaria. (Benavente G., 2007)

X. CONCLUSIÓN

- 1- Se analizaron mediante los métodos convencionales los productos lácteos artesanales según FDA-BAM, obteniendo como resultado *Escherichia coli* con 100% de muestras positivas, *Staphylococcus aureus* con 35% de muestras positivas, con ausencia de *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*.
- 2- Mediante la PCR Tiempo Real se logró detectar un 5% de positividad para *Salmonella spp* y ausencia de *Listeria monocytogenes*.
- 3- Al analizar las condiciones higiénico-sanitarias en la elaboración de los productos lácteos artesanales, se obtuvo en un 100 % de las muestras del personal de ordeño Coliformes Totales, Fecales y *Escherichia coli* , así como un 100 % para Coliformes Totales, 75% Coliformes Fecales y un 25% de *Escherichia coli* en muestras de manipuladores.
- 4- En el 50% de las muestras de utensilios se obtuvo Coliformes Totales, Fecales y *Escherichia coli*. De la misma manera en la muestra de agua de pozo se encontró una positividad del 100% para Coliformes Totales y Fecales; Siendo el agua de grifo la única que presento calidad sanitaria aceptable.

XI. RECOMENDACIONES

Al Ministerio de Salud

A realizar estudios de vigilancia epidemiológica en diferentes fincas a nivel nacional que permitan tener un diagnóstico actualizado de la calidad microbiológica de los diferentes productos artesanales elaborados.

A la Universidad

Continuar promoviendo estudios en el área de Microbiología de los Alimentos que contribuyan a resolver problemáticas a nivel territorial, así como la prevención de enfermedades de transmisión alimentaria en la población.

Al productor

Poner en práctica las medidas higiénicas sanitarias durante la manipulación y el procesamiento de los productos lácteos para evitar la contaminación cruzada que puedan poner en riesgo al consumidor y así brindar un producto con mejor calidad microbiológica.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Quistián García , H. (30 de Octubre de 2014). Obtenido de <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/numero-mas-probable-nmp.html>
- agroalimentaria, F. V. (28 de Febrero de 2013). *Listeria monocytogenes*. *Elika*, 1-5.
- Ailín Martínez, A. V. (2013). Evaluación de la calidad e inocuidad de quesos frescos artesanales. *Salud Animal*, 35(03), 210-213.
- ainia. (s.f.). Obtenido de https://www.ainia.es/html/sites/09/pdf/deteccion_patogenos_pcr.pdf
- Alcazar. (2006). *Deteccion de Salmonella spp y Listeria monocytogenes en quesos frescos y semimadurados*. Mexico.
- Aleman, D. F. (2014). *Aislamiento y detección de Listeria monocytogenes en queso fresco artesanal que se expende en el mercado Ivan Montenegro*. Managua.
- Alonso Nore, L. X., & Poveda Sanchez, J. A. (Diciembre de 2008). *Javeriana*. Obtenido de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf>
- Anthony D. Hitchins, K. J. (2016). Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. En F. a. (FDA), *Bacteriological Analytical Manual*.
- Araneda, M. (1 de Agosto de 2015). *Edualimentaria.com*. Obtenido de <http://www.edualimentaria.com/leche-y-derivados-composicion-y-propiedades>
- australiana, C. I. (s.f.). *Leche y nutricion*. Obtenido de <http://www.lecheynutricion.es/grupos-de-alimentos/leche-y-derivados>
- Aycachi Inga, R. (16 de Octubre de 2008). *Scribd*. Obtenido de <https://es.scribd.com/doc/6907272/Microbiologia-de-Alimentos-Analisis-Microbiologico-Leche-y-Derivados>
- Benavente G., B. J. (2007). *Practicas de correcta higiene alimentaria*. España.
- Britanialab. (s.f.). Obtenido de <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/lauril.htm>
- Britanialab. (s.f.). *Britanialab*. Obtenido de http://www.britanialab.com/productos/229_hoja_tecnica_es.pdf
- Brizzio, A. (2009). *Aplicación de una reacción de PCR Multiplex para identificación de S.aureus*. San Martín.
- Camacho, A. S. (2007). *Incidencia de Listeria monocytogenes en leche de vaca*. Pamplona, Colombia.

- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., & Serrano, B. (2009). *Facultad química*. Obtenido de UNAM: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf
- Carreño Mora, E. (2004). *Cybertesis*. Obtenido de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fac314f/doc/fac314f.pdf>
- CECAM. (s.f.). *MANUAL DE APLICACIÓN DEL SISTEMA APPCC EN INDUSTRIAS LÁCTEAS DE CASTILLA-LA MANCHA*. Espacio Eme Diseño Creativo, S.L.
- Cristobal Delgado, R. L., & Maurtua Torres, D. J. (s.f.). *Scielos*. Obtenido de <http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v14n3/a02v14n3>
- Delgado Ruth, T. D. (2001). *Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú*. Lima, Perú.
- Depa fquim unam. (s.f.). Obtenido de En la fase presuntiva el medio de cultivo que se utiliza es el caldo lauril sulfato de sodio el
- Depa fquim unam. (s.f.). Obtenido de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/patogNOMStaphylococcus aureus_17365.pdf
- Departamento de química. (s.f.). Obtenido de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U4b_MedicionCrecimiento_19837.pdf
- DIBICO. (s.f.). *DIBICO*. Obtenido de <http://www.dibico.com/fichast/1159.pdf>
- Editorial. (16 de Julio de 2013). *Conocimientosweb.net*. Obtenido de La nueva divisa del milenio: <http://www.conocimientosweb.net/dcmt/ficha19382.html>
- Elika. (28 de Febrero de 2013). Obtenido de http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento82/1.Salmonella.pdf
- Espinoza Ana, T. M. (2003). Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal. *Revista Peruana de Medicina*, 21(2), 71-75.
- Facultad de Química. (s.f.). Obtenido de UNAM: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Analisis_Agua_NMP_22309.pdf
- Fenlon, D. W. (1989). The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk from farm bulk tanks in North-East Scotland. 191-196.
- INPYME, & JICA. (s.f.). *JICA.go*. Obtenido de http://www.jica.go.jp/nicaragua/espanol/office/others/c8h0vm000001q4bc-att/14_agriculture01.pdf

- Jirón Aragón, W. J., & Aburto Aragón, E. M. (2007). *Repositorio institucional*. Obtenido de <http://repositorio.una.edu.ni/2725/#sthash.7YswDnT5.dpuf>
- Leyer, J. (1992). Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp in cheese. *J. Food Prod*, 2075-80.
- Manual de la OIE sobre animales terrestres . (2008). http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.07.%20Listeria%20monocytogenes.pdf.
- Mejía Jurado , L. D. (4 de Abril de 2009). *Blogspot*. Obtenido de <http://listeriamonocytogenes.blogspot.com>
- Méndez Flores, D. (2011). *Ciencias medicas*. Obtenido de <http://blog.ciencias-medicas.com/archives/1373>
- Micro de los Alimentos*. (27 de Octubre de 2008). Obtenido de <http://mikroalimentos.blogspot.com/2008/10/coliformes-totales-y-fecales.html>
- Murray, P., Rosenthal, P., & Pfäuer, M. (s.f.). *Microniología Médica*. Madrid: GEA CONSULTORÍA EDITORIAL, S.L.L.
- OIE. (2004). *Listeria monocytogenes*. En *Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004* (págs. 1222-1237).
- Onmeda.es*. (2016). Obtenido de <http://www.onmeda.es/enfermedades/listeriosis-causas-18021-3.html>
- Organizacion mundial de la salud*. (Agosto de 2013). Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>
- Organizacion mundial de la salud*. (Octubre de 2016). Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
- PAHO., O. P. (2016). *Inocuidad de Alimentos - Control Sanitario - HACCP*. Washington, D.C. Obtenido de Organización Mundial de la Salud.
- Pichardo. (s.f.). *Wordpress*. Obtenido de <https://clpichardo.files.wordpress.com/2012/05/procesamiento-de-lacteos.pdf>
- Plaza. (2011). *Análisis microbiológico en quesos frescos que se expende en supermercados*. Guayaquil, Ecuador.
- Ramírez. (2010). *Detección de Listeria monocytogenes en queso blanco mediante PCR*. Caracas, Venezuela.

- Recinto universitario de Mayaguez. (s.f.). Obtenido de <http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p4-nmpenumeracion.pdf>
- Robledo, A. (2015). *Investigacion de Salmonella spp en alimentos mediante el metodo tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimaticos*. Barcelona.
- Rodríguez, C., Caldas, L., & Ogeerally, P. (26 de Octubre de 2009). Calidad sanitaria en queso artesanal tipo “telita”. Upata, estado Bolívar, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 1-5.
- Rojas Herrera, R. A., & Gonzalez Flores, T. (2006). *Mediagraphic*. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2006/bq062e.pdf>
- Romero, L. (2015). *Evaluación fisico-química y microbiológica del proceso de elaboración del queso doble crema en una fabrica de lacteos del municipio de Belén*. Colombia.
- Romero, M. (1999). *Caracterizacion microbiologica de quesos elaborados por pequeños productores de leche bovina de la comuna de los Muermos*. Llanquihue, Chile.
- Rubio Lozano, A. M. (2006). Detección de Salmonella spp y Listeria monocytogenes en quesos frescos y semimadurados que se expenden en vía pública en la Ciudad de México. *Veterinaria Mexico OA*, 37(004), 417-4269.
- Sánchez Tarragó, L. (s.f.). *Biblioteca virtual de vigilancia en salud*. Obtenido de http://www.bvs.sld.cu/uats/rtv_files/rtv0997.htm
- Schobitz, M. H. (2001). Presencia de Listeria monocytogenes en leche cruda y quesos frescos artesanales. *UACH*.
- Serrato Diaz, A., Renteria, L., Aportela Cortez, J., & Sierra Palacios, E. (s.f.). *inecc*. Obtenido de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/pcr.pdf>
- Signorini, M. L., Sequeira, G. J., Bonazza, J. C., Dalla Santina, R., Marti, L. E., Frizo, L. S., & Rosmini, M. R. (2008). *Saber.ula*. Obtenido de <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/23640/2/articulo12.pdf>
- Taylor, R. M. (1998). Retention of oral microorganism on cobaltchromium alloy and dental acrylic resin with different surfaces finishes. *Journal prosthetic dentistry*(80), 592-597.
- unam, D. f. (s.f.). Obtenido de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Pagogenosnorm.Salmonella_17364.pdf

- UNSA. (s.f.). Obtenido de <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/14%20leche%20y%20derivados.pdf>
- Vazquez. (1999). *Presencia de especies de Listeria en la leche cruda en granjas*. Mexico.
- Vazquez, L., Selva O'Neil, Q., & Legnami, D. (s.f.). Obtenido de http://www.montevideo.gub.uy/sites/default/files/importancia_de_los_coliformes_en_los_alimentos.pdf
- Velazquez, O., Serrano, B., Palao, M., Ortegón, A., & Giles, M. (2009). *Depa fquim unam*. Obtenido de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Colif-tot-fecales-Ecoli-NMP_6529.pdf
- Vera, A., & Al., e. (2013). *Principales factores de virulencia de Listeria monocytogenes*. Chile.
- Villalobos de B., L. B. (2009). Aislamiento e identificación por métodos convencionales y PCR de *Listeria Monocytogenes* en quesos blancos frescos comercializados en Cumana, Venezuela. *SABER-ULA*, XVII(005), 529-536.
- Zendejas Manzo, G. S., Avalos Flores, H., & Soto Padilla, M. Y. (2014). *Rev Biomed*. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>

ANEXOS

Tabla 1. Presencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* por métodos convencionales según FDA-BAM.

Microorganismo	Frecuencia	Porcentaje
<i>Escherichia coli</i>	20	100%
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	35%
<i>Salmonella spp</i>	0	0%
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0%
Total	20	100%

Tabla 2. Requisitos microbiológicos para quesos según NTON 03 065-06

Microorganismos	n(1)	c(2)	m(3)	M(4)
<i>Staphylococcus aureus</i> , UFC/cm ³	5	1	10 ²	10 ³
<i>Coliformes totales</i> , UFC/cm ³	5	2	200	500
<i>Coliformes fecales</i> , UFC/cm ³	5	1	10	10
<i>Escherichia coli</i> , UFC/cm ³	5	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 gramos	5	0	Ausencia	Ausencia
<i>Salmonella</i> en 25 gramos	5	0	Ausencia	Ausencia

(1) n = Número de muestras que deben analizarse

(2) c = Número de muestras que se permite que tengan un recuento mayor que m pero no mayor que M.

(3) m = Recuento máximo recomendado

(4) M = Recuento máximo permitido

Tabla 3. Resultados de métodos convencionales por microorganismo

Producto	Lote	Microorganismo			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Cuajada	1	150,000 NMP/g	11x10 ⁴ UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	2	46,000 NMP/g	8x10 ¹ UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	3	7.4000 NMP/g	11x10 ³ UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	4	460,000 NMP/g	10x10 ¹ UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	5	28,000 NMP/g	19x10 ² UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
Quesillo	6	11,000 NMP/g	1x10 ¹ UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	7	150 NMP/g	3x10 ³ UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	8	29 NMP/g	16x10 ³ UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	9	280 NMP/g	6x10 ¹ UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	10	460 NMP/g	13x10 ³ UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
Queso Fresco	11	3,800 NMP/g	0 UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	12	1,500 NMP/g	0 UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	13	93 NMP/g	0 UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	14	1,100 NMP/g	0 UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	15	11,000 NMP/g	0 UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
Leche	16	<3.0 NMP/g	0 UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	17	3.0 NMP/g	6x10 ⁰ UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	18	38 NMP/g	3x10 ⁰ UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	19	23 NMP/g	18x10 ² UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g
	20	430 NMP/g	3x10 ¹ UFC	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g

Tabla 4. Resultados de pruebas por PCR

Producto	Lote	Microorganismo	
		<i>Salmonella spp.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Cuajada	1	Ausencia	Ausencia
	2	Ausencia	Ausencia
	3	Presencia	Ausencia
	4	Ausencia	Ausencia
	5	Ausencia	Ausencia
Quesillo	6	Ausencia	Ausencia
	7	Ausencia	Ausencia
	8	Ausencia	Ausencia
	9	Ausencia	Ausencia
	10	Ausencia	Ausencia
Queso	11	Ausencia	Ausencia
	12	Ausencia	Ausencia
	13	Ausencia	Ausencia
	14	Ausencia	Ausencia
	15	Ausencia	Ausencia
Leche	16	Ausencia	Ausencia
	17	Ausencia	Ausencia
	18	Ausencia	Ausencia
	19	Ausencia	Ausencia
	20	Ausencia	Ausencia

Tabla 5. Frecuencia de muestras positivas por PCR

Microorganismo	Frecuencia	Porcentaje
<i>Salmonella spp</i>	1	5%
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0%
Total	20	100%

Tabla 6. Presencia de microorganismos en distintos puntos de la línea de producción de los productos lácteos.

	Coliformes Totales	Coliformes Fecales	<i>Escherichia coli</i>
Personal de ordeño	Positivo	Positivo	Positivo
	Positivo	Positivo	Positivo
	Positivo	Positivo	Positivo
	Positivo	Positivo	Positivo
Utensilios	Positivo	Positivo	Positivo
	Negativo	Negativo	Negativo
	Negativo	Negativo	Negativo
	Positivo	Positivo	Positivo
Manipuladores	Positivo	Positivo	Positivo
	Positivo	Negativo	Negativo
	Positivo	Positivo	Negativo
	Positivo	Positivo	Negativo

Tabla 7. Frecuencia de microorganismos en los diferentes puntos de elaboración de productos lácteos.

Microorganismo	Personal de Ordeño	Utensilios	Manipuladores	Agua de pozo	Aguade Grifo
Coliformes Totales	100%	50%	100%	100%	0%
Coliformes fecales	100%	50%	75%	100%	0%
<i>Escherichia coli</i>	100%	50%	25%	0%	0%

Tabla 8. Lectura de coliformes en alimentos por el NMP.

Código	Determinaciones	10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶		10 ⁻⁷		10 ⁻⁸	
		24 h	48 h														
C1	C. Lauril Simple	3		3		3		3		3		3		1	0	0	0
	C. Verde Brillante	3		3		3		3		3		3		1	0		
	Caldo E C	3		3		3		3		3		0	2	1	0		
	E. Mug/EMB	3		3		3		3		3		2		1	0		
C2	C. Lauril simple	3		3		3		3		3		3		0	0	0	0
	C. Verde Brillante	3		3		3		3		3		3					
	Caldo E C	3		3		3		3		2	0	0					
	E. Mug/EMB	3		3		3		3		1							
C3	C. Lauril simple	3		3		3		3		3		1	0	1		0	1
	C. Verde Brillante	3		3		3		3		3		1	0	1		1	
	Caldo E C	3		3		3		2	0	3		1	0	0	0	0	
	E. Mug/EMB	3		3		3		2	0	1		1	0				
C4	C. Lauril simple	3		3		3		3		3		2	0	1		0	1
	C. Verde Brillante	3		3		3		3		3		2		1		1	
	Caldo E C	3		3		3		3		3		1	0	0	0	0	
	E. Mug/EMB	3		3		3		3		3		1					
C5	C. Lauril simple	3		3		3		3		3		3		1		0	1
	C. Verde Brillante	3		3		3		3		3		3		1		1	
	Caldo E C	3		3		3		3		2		2	0	0	0	0	
	E. Mug/EMB	3		3		3		2		2		1					

Tabla 10. Resultados obtenidos por recuento en placa para *Staphylococcus aureus*

Producto	Muestra	Diluciones							
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Cuajada	1		DPC	DPC	DPC	127UFC			
	2		DPC	DPC	DPC	80 UFC			
	3		DPC	DPC	DPC	130UFC			
	4		DPC	DPC	DPC	DPC	DPC	110UFC	12 UFC
	5		DPC	DPC	DPC	DPC	DPC	125UFC	22 UFC
Quesillo	6		90 UFC	10 UFC	0 UFC	0 UFC			
	7		38 UFC	2 UFC	0 UFC	0 UFC			
	8		19 UFC	1 UFC	0 UFC	0 UFC			
	9		60 UFC	1 UFC	0 UFC	0 UFC			
	10		15 UFC	0 UFC	0 UFC	0 UFC			
Queso fresco	11		0 UFC	0 UFC	0 UFC	0 UFC			
	12		0 UFC	0 UFC	0 UFC	0 UFC			
	13		0 UFC	0 UFC	0 UFC	0 UFC			
	14		0 UFC	0 UFC	0 UFC	0 UFC			
	15		0 UFC	0 UFC	0 UFC	0 UFC			
Leche	16		7 UFC	0 UFC	0 UFC	0 UFC			
	17		DPC	8 UFC	1 UFC	0 UFC			
	18		4 UFC	0 UFC	0 UFC	0 UFC			
	19		30 UFC	0 UFC	0 UFC	0 UFC			
	20		DPC	40 UFC	3 UFC	0 UFC			

DPC: Demasiado para contar UFC: Unidad Formadora de Colonia

Tabla 11. Resultados obtenidos por la prueba de coagulasa para *Staphylococcus aureus*.

Producto	Muestra	Coagulasa		%	UFC/g <i>S.aureus</i> Coagulasa Positiva
		+	-		
Cuajada	1	7	1	87.5	11x10 ⁴ UFC
	2	8	0	100	8x10 ¹ UFC
	3	7	1	87.5	11x10 ³ UFC
	4	7	1	87.5	10x10 ¹ UFC
	5	7	1	87.5	19x10 ² UFC
Quesillo	6	8	0	100	1x10 ¹ UFC
	7	7	1	87.5	3x10 ³ UFC
	8	7	1	87.5	16x10 ³ UFC
	9	8	0	100	6x10 ¹ UFC
	10	7	1	87.5	13x10 ³ UFC
Queso fresco	11	0	0	0	0 UFC
	12	0	0	0	0 UFC
	13	0	0	0	0 UFC
	14	0	0	0	0 UFC
	15	0	0	0	0 UFC
Leche	16	0	5	0	0 UFC
	17	6	2	75	6x10 ⁰ UFC
	18	3	1	75	3x10 ⁰ UFC
	19	5	3	62.5	18x10 ² UFC
	20	7	1	87.5	3x10 ¹ UFC

DPC: Demasiado para contar UFC: Unidad Formadora de Colonia

Tabla 12. Preparación de Master Mix para *Salmonella spp*

<i>Salmonella spp</i>		
Volumen total	Reacción uL	
Salm-ttr	10	[]
FastStart Universal Probe M	5	1x
10x Exo Internal pos	1	1x
50x Exo IPC DNA	0.2	1x
Sonda Salm ttr-5 10 uM	0.25	0.25
Primer 20 ttr-6 F 10 uM	0.4	0.4
Primer 21 ttr-4 R 10 uM	0.4	0.4
Agua	1.75	
Template	1	
Total	10	

Tabla 13. Preparación de Master Mix para *Listeria monocytogenes*

<i>Listeria monocytogenes</i>		
Volumen total	Reacción uL	
ListMono-LisP	10	[]
FastStart Universal Probe M	5	1x
10x Exo Internal pos	1	1x
50x Exo IPC DNA	0.2	1x
Sonda ListP 10 uM	0.4	0.4
Primer 50 LMrt 3 F 10 uM	0.6	0.6
Primer 51 LMrt 3 R 10 uM	0.6	0.6
Agua	1.2	
Template	1	
Total	10	

Tabla 14. Costos de método estándar por muestra

COSTO DE MÉTODO ESTANDAR POR MUESTRA				
	MEDIO	Costo por gr	Cantidad de gr/L	Costo por gr en dólar
Coliformes totales, coliformes fecales y <i>E.coli</i>	Caldo Lauril Simple	1.89	35.6	0.412
	Caldo Lauril Concentrado	3.78	71.2	1.648
	Caldo Bilis Verde Brillante	1.289	40	0.316
	Caldo E.coli	3.094	37	0.280
	Caldo E.coli + MUG	3.352	37	0.304
<i>Salmonella spp.</i>	APB		1	
	Peptona de Carne	2.063	10	0.001
	Cloruro de Sodio	0.333	5	0.000
	Hidrogeno Fosfato dibasico	2.275	9	0.001
	Hidrogeno de sodio	0.62	5	0.000
	Rappaport	2.24		
	Trytone			
	Nacl	0.333	7.2	0.0001
	KH ₂ PO ₄	1.015	1.45	0.0001
	MgCl ₂ -6H ₂ O	4.109	13.4	0.002
	Oxalato de Malaquita	6.75	0.036	0.00001
	XLD	2	53	0.004
	Sulfito Bismuto	2.783	52.33	0.005
	Hektoen	1.547	75	0.004
	TSI	1.871	35	0.007
	LIA	2.94	34.6	0.010
	UREA	1.805	24	0.004
	MIO	2.33	31	0.007
	CITRATO	6.074	24.2	0.015
<i>Listeria monocytogenes</i>	LEB	2.367	36.1	0.006
	Oxford	7.076	57.5	0.346
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bp	2.063	30	0.013
	Yema de Huevo/ml	5.529	50	0.376
	Telurito de potasio	8.364	7.5	
	BHI	1.547	37	1.947
	Plasma de conejo/ml	82.49	0.3	6.734
	Bolsas de stomacher	9.473	3	0.967
	Platos	2.4821	11	0.929
	Agua			
TOTAL				12.442

Tabla 15. Costos de método molecular por muestra

Costo de PCR TR por muestra	
Descripción	Costo \$ Por Prueba
TaqMan Fast universal PCR master Mix (2x)	0.13
Sonda (ttr-5)FAM-CACCGACGGCGAGACCGACTTTDarkQuencher	1.18
IntanGeneMatrix	0.234
TaqManinternal positive	0.2
Primers	1.9
Total	3.04

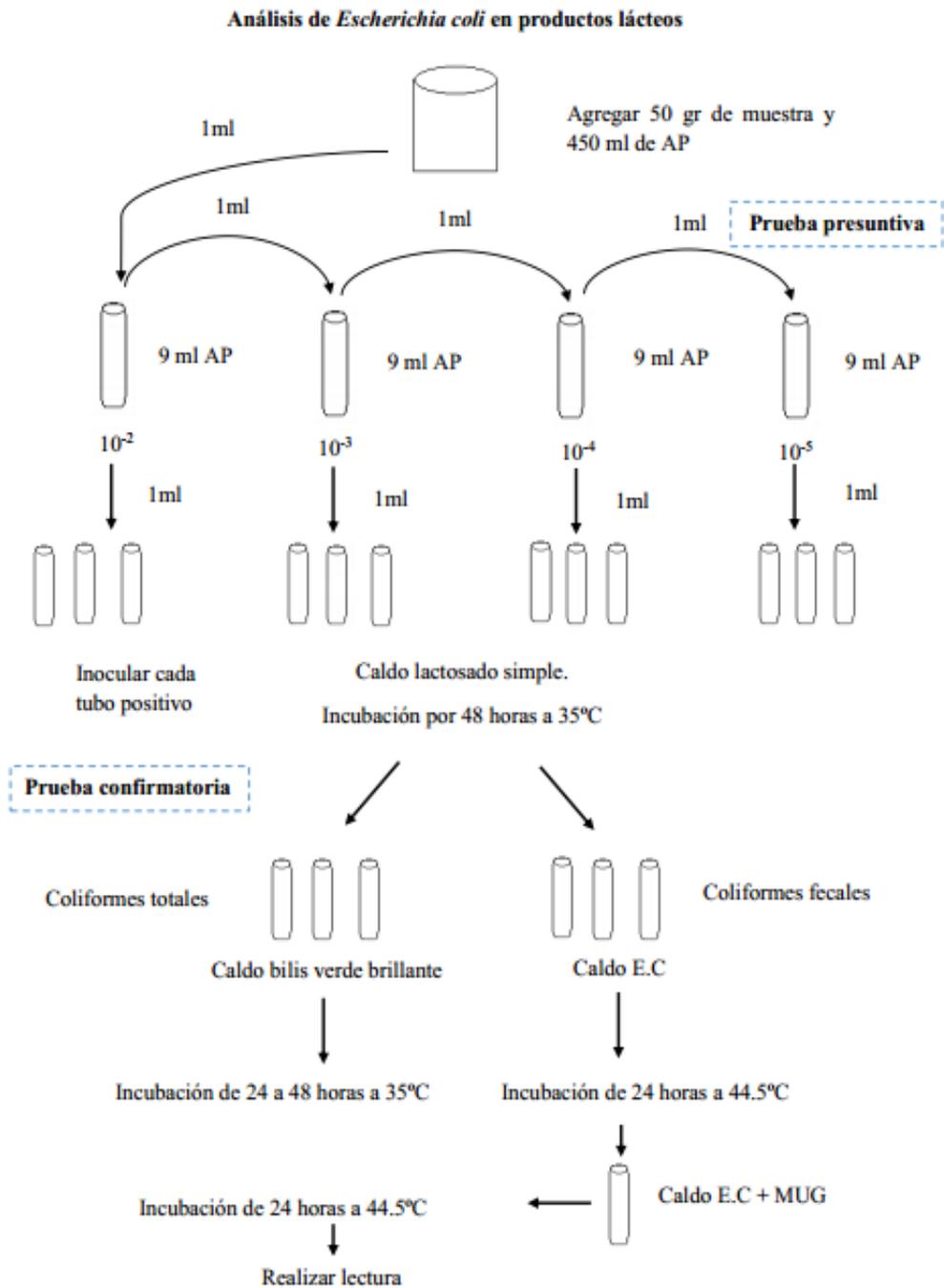
Tabla 16. Costo Total

Método	Por muestra	Total de Muestras	Costo Dólares
Convencional	12.442	20	248.840
PCR-TR	7	20	140.000
Total del gasto			388.840

Tabla 17. Materiales utilizados

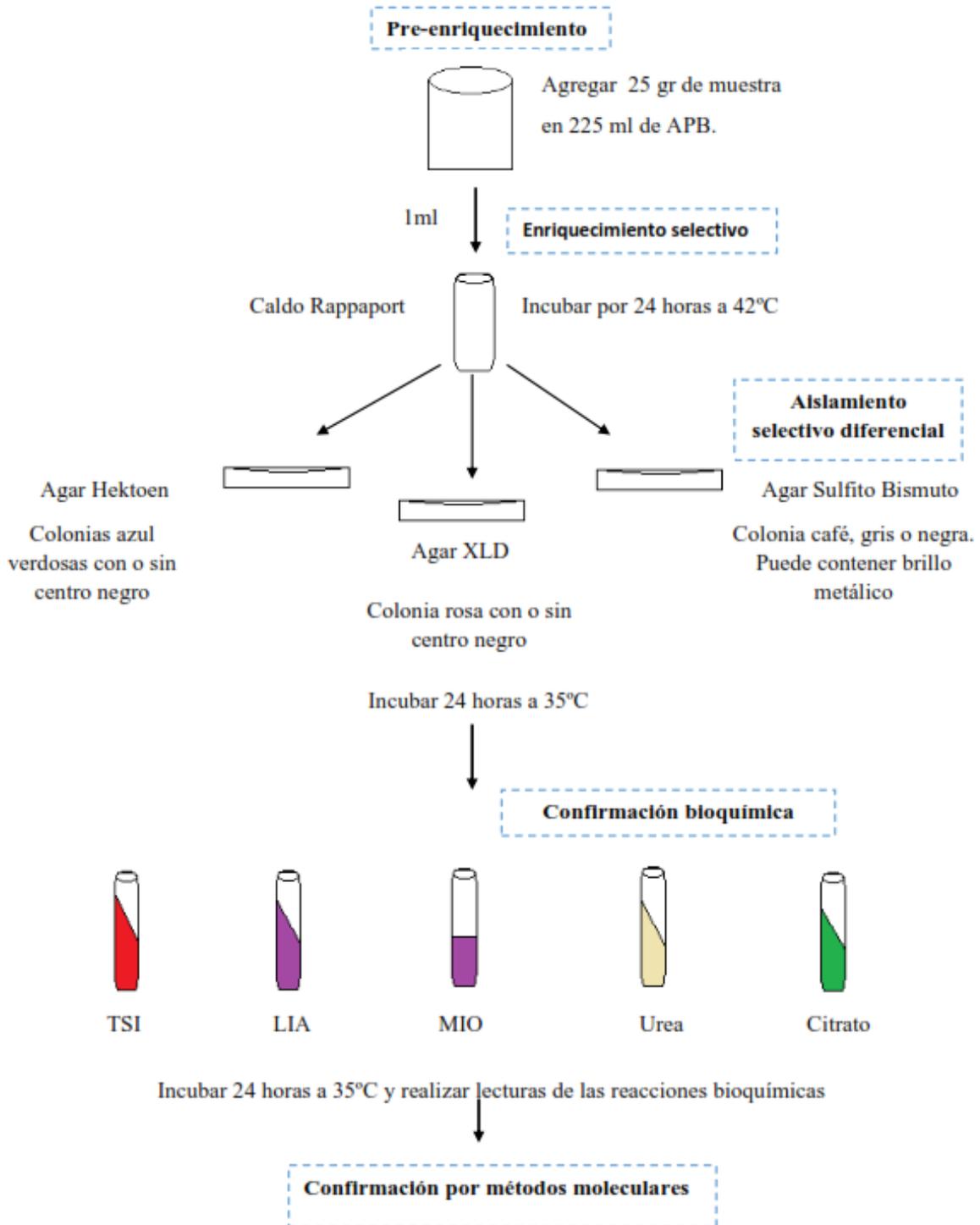
Campana de seguridad nivel 1.	Mecheros	Kit Dynabeads ^R DNA	Pipetas
Balanza analítica.	Bolsas stomacher	DIRECT TM Universal	automáticas
Stomacher	Platos Petri	Step One Plus Applied	Puntas
Centrifuga	Gradillas	Biosystems.	Pinzas
Thermomixer	Tijeras		Hisopos estériles

Flujograma para el análisis de *Escherichia coli*



Flujograma para el análisis de *Salmonella spp.*

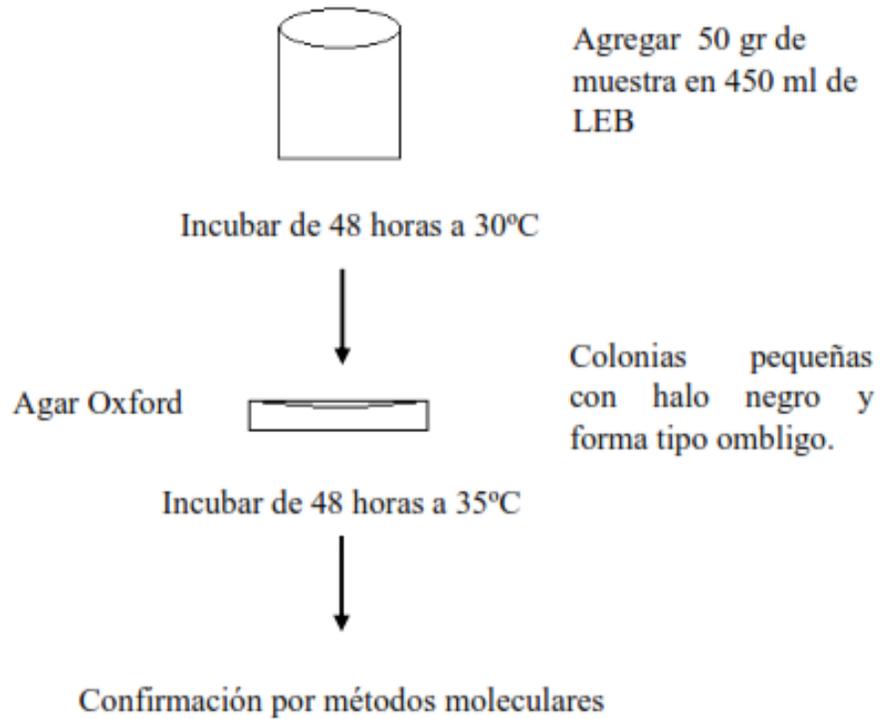
Análisis de *Salmonella spp.* en productos lácteos



Elaborado por: Katherinne Mena, Janelys Solís, Ana Urbina

Flujograma para el análisis de *Listeria monocytogenes*.

Análisis de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos



Elaborado por: Katherinne Mena, Janelys Solís, Ana Urbina

Tablas para realizar lectura NMP

TABLA 9221: IV. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS COMBINATION OF POSITIVE RESULT WHEN FIVE TUBES ARE USED PER DILUTION

Combinación de tubos positivos			NMP/100mL	Límites de 95% de confianza		Combinación de tubos positivos			NMP/100mL	Límites de 95% de confianza	
				Inferior	Superior					Inferior	Superior
0	0	0	< 1.8	-	6.8	4	0	3	25	9.8	70
0	0	1	1.8	0.090	6.8	4	1	0	17	6.0	40
0	1	0	1.8	0.090	6.9	4	1	1	21	6.8	42
0	1	1	3.6	0.70	10	4	1	2	26	9.8	70
0	2	0	3.7	0.70	10	4	1	3	31	10	70
0	2	1	5.5	1.8	15	4	2	0	22	6.8	50
0	3	0	5.6	1.8	15	4	2	1	26	9.8	70
1	0	0	2.0	0.10	10	4	2	2	32	10	70
1	0	1	4.0	0.70	10	4	2	3	38	14	100
1	0	2	6.0	1.8	15	4	3	0	27	9.9	70
1	1	0	4.0	0.71	12	4	3	1	33	10	70
1	1	1	6.1	1.8	15	4	3	2	39	14	100
1	1	2	8.1	3.4	22	4	4	0	34	14	100
1	2	0	6.1	1.8	15	4	4	1	40	14	100
1	2	1	8.2	3.4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	0	8.3	3.4	22	4	5	0	41	14	100
1	3	1	10	3.5	22	4	5	1	48	15	120
1	4	0	10	3.5	22	5	0	0	23	6.8	70
2	0	0	4.5	0.79	15	5	0	1	31	10	70
2	0	1	6.8	1.8	15	5	0	2	43	14	100
2	0	2	9.1	3.4	22	5	0	3	58	22	150
2	1	0	6.8	1.8	17	5	1	0	33	10	100
2	1	1	9.2	3.4	22	5	1	1	46	14	120
2	1	2	12	4.1	26	5	1	2	63	22	150
2	2	0	9.3	3.4	22	5	1	3	84	34	220
2	2	1	12	4.1	26	5	2	0	49	15	150
2	2	2	14	5.9	36	5	2	1	70	22	170
2	3	0	12	4.1	26	5	2	2	94	34	230
2	3	1	14	5.9	36	5	2	3	120	36	250
2	4	0	15	5.9	36	5	2	4	150	58	400
3	0	0	7.8	2.1	22	5	3	0	79	22	220
3	0	1	11	3.5	23	5	3	1	110	34	250
3	0	2	13	5.6	35	5	3	2	140	52	400
3	1	0	11	3.5	26	5	3	3	170	70	400
3	1	1	14	5.6	36	5	3	4	210	70	400
3	1	2	17	6.0	36	5	4	0	130	36	400
3	2	0	14	5.7	36	5	4	1	170	58	400
3	2	1	17	6.8	40	5	4	2	220	70	440
3	2	2	20	6.8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	0	17	6.8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	1	21	6.8	40	5	4	5	430	150	1100
3	3	2	24	9.8	70	5	5	0	240	70	710
3	4	0	21	6.8	40	5	5	1	350	100	1100
3	4	1	24	9.8	70	5	5	2	540	150	1700
3	5	0	25	9.8	70	5	5	3	920	220	2600
4	0	0	13	4.1	35	5	5	4	1600	400	4600
4	0	1	17	5.9	36	5	5	5	>1600	700	-
4	0	2	21	6.8	40						

Fuente: STANDARD METHODS 9221 B. STANDARD TOTAL COLIFORM FERMENTATION TECHNIQUE , JUNE 2003

Tabla Serie 5 Tubos	
Numero de tubos positivos	NMP/ 1000 ml
0	<2.2
1	2.2
2	5.1
3	9.2
4	16
5	>16

Table 1 For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals.											
Pos. Tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
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	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	-

Figura 1. Toma de muestra



Figura 2. Preparación de muestras



Figura 3. Caldo lauril simple



Figura 4. Caldo bilis verde brillante



Figura 5. Caldo EC

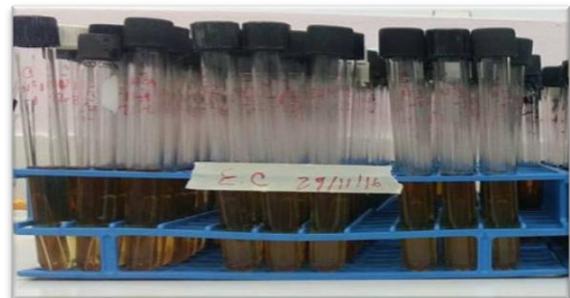


Figura 6. Caldo EC+MUG



Figura 7. Caldo EC+MUG (Lectura)



Nota: Fotos originales obtenidas durante el estudio

Figura 8. *Escherichia coli* en EMB



Figura 9. Bioquímicas *Salmonella spp*

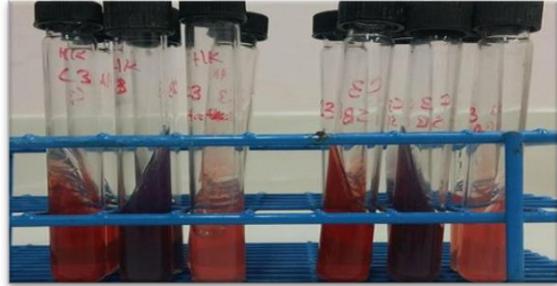


Figura 10. *S. aureus* en Baird-Parker

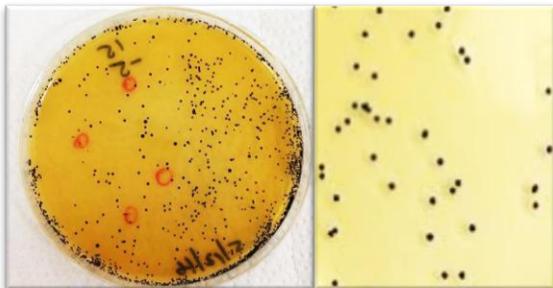


Figura 11. Prueba de coagulasa



Figura 12. Thermomixer



Figura 13. Kit de extracción



Figura 14. Centrifugadora



Figura 15. Applied BioSystems



Figura 16. Elaboración de los productos



Nota: Fotos originales obtenidas durante el estudio

Carta de Autorización

Juigalpa, Chontales

28 Octubre 2016

A Quien Concierno:

Yo *Catalina del Carmen Barillas* con cédula N° *121-251136-0000K* propietario de la finca San Diego, ubicada en el km 137 carretera a Cuapa, autorizo que se realice la toma de muestras de los productos lácteos elaborados artesanalmente en nuestras instalaciones y estas sean procesadas en el Laboratorio del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR-MINSA), para llevar a cabo el siguiente estudio:

Evaluación microbiológica de productos lácteos artesanales: Leche cruda, queso fresco, quesillo y cuajada elaborados en la finca San Diego, del Municipio de Cuapa, Chontales, Noviembre-Diciembre 2016.

Del cual previamente se me dio a conocer el propósito de dicho estudio por las autoras:

Bra. Katherinne Dayanara Mena Lozano

Bra. Janelys Elieth Solis López

Bra. Ana Teresa Urbina Rodríguez

Deseando éxito en su investigación y confiando que de la misma resulte una aportación valiosa para el mejoramiento de la calidad de nuestros productos lácteos, y en la formación de futuros profesionales del país.

Saludos Cordiales;



Catalina Barillas

Propietario
Finca San Diego

Carta de Aprobación



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
Instituto politécnico de la salud
LUÍS FELIPE MONCADA
Departamento de Bioanálisis Clínico

“AÑO DE LA MADRE TIERRA”
Managua, 18 de noviembre del 2016.

Lic. Martha Emelina Delgado
Directora
Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia
Sus Manos.

Estimada Licenciada Delgado. Reciban un cordial saludo de mi parte.

Sirva la presente para confirmarles que se ha aceptado la solicitud de aprobación de tema titulado: **Evaluación microbiológica de productos lácteos artesanales: Leche cruda, queso fresco, quesillo y cuajada elaborados en la finca San Diego, del Municipio de Cuapa Chontales, noviembre-diciembre 2016.**

Este trabajo es tutorado por el MSc. Isaac Martínez de ese mismo centro.

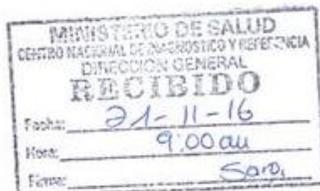
Sin más a que hacer referencia, me suscribo.

Cordialmente,

Msc. Ligia Lorena Ortega Valdés
Directora Dpto. Bioanálisis Clínico
POLISAL-UNAN-MANAGUA



CC: MSc. Francisco Romero Oviedo
MSc. Isaac Martínez
* Archivo.



21-11-16
9:05 am