



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis de la seguridad microbiológica de alimentos listos para el consumo

Alumno: Laura Bolívar Castilla

Junio, 2019



Facultad de
Ciencias Experimentales

UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis de la seguridad microbiológica de alimentos listos para el consumo

Alumno: Laura Bolívar Castilla

Junio, 2019

ÍNDICE

0. Resumen y Abstract	4
1. Introducción	5
1.1. Alimentos listos para el consumo	5
1.1.1. Generalidades.....	5
1.1.2. Microorganismos patógenos presentes en los alimentos.....	6
1.1.3. Riesgos de los alimentos listos para el consumo.....	8
1.2. Métodos de seguridad alimentaria.	8
1.2.1. Principios del sistema APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos)	8
1.2.2. Métodos de conservación	9
1.2.3 Parámetros permitidos por la legislación de seguridad alimentaria nacional	12
2. Objetivos	17
3. Material y métodos	18
3.1 Alimentos.....	18
3.2. Métodos de cultivo y soluciones.....	18
3.3. Material de laboratorio empleado	24
3.4. Determinación de patógenos y carga microbiana total.....	24
3.5. Tinción diferencial de Gram.....	27

4. Resultados	29
4.1. Determinación de la carga microbiana en los alimentos listos para el consumo	29
4.1.1. Carga microbiana total (TSA).....	29
4.1.2. Detección de patógenos en medios selectivos	30
4.2 Identificación preliminar de los microorganismos detectados en medios selectivos.....	34
5. Discusión	36
6. Conclusiones	39
7. Bibliografía	40

0. RESUMEN

En la actualidad cada vez hay una mayor ingesta de alimentos listos para el consumo tanto en las casas como fuera de ellas. Esta situación ha dado lugar a un gran desarrollo de la tecnología de los alimentos. Sin embargo, esto ha conllevado a la aparición de problemas que no han pasado desapercibidos para los organismos que se encargan de la salud y de la producción, como la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) (López et al., 2003).

Es por ello que la seguridad de los alimentos, con el objetivo de evitar intoxicaciones y/o infecciones, se ha convertido en una de las mayores prioridades del consumidor. En este trabajo, el análisis de seis tipos diferentes de alimentos listos para el consumo, nos muestra como hoy en día siguen encontrándose microorganismos presentes en casi todos ellos. El consumo de esos alimentos pueden provocar el desarrollo de enfermedades, ya que se tratan de patógenos que pueden producir intoxicaciones/infecciones alimentarias siendo unas más graves que otras, pudiendo incluso producir la muerte en determinadas ocasiones.

ABSTRACT

Nowadays, there is a growing intake of ready-to-eat food both in and of homes. This situation has led to a great development of food technology. Nevertheless, this has led to the emergence of problems that have not gone unnoticed by health and production agencies, such as FAO (United Nations Organization for the Agriculture and the Supply) and the WHO (World Health Organization). (López et al., 2003).

This is why the safety of food, with the aim of preventing intoxications and/or infections, has become one of the highest priorities of the consumer. In this work, the analysis of six different types of ready-to-eat foods, shows us how microorganisms are present in almost all of them today. The consumption of these foods can cause the development of diseases, since they are pathogens that can cause food poisonings/infections, some being more serious than others, and may even cause death in certain cases.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alimentos listos para el consumo

1.1.1. Generalidades

Los alimentos listos para el consumo son alimentos procesados, ya sean crudos o cocidos, que pueden ponerse a la venta fríos o calientes y que pueden consumirse sin ningún tratamiento adicional. En los últimos años la reputación de éstos ha aumentado ya que ofrecen una opción fácil y nutritiva para el consumidor. (Rodríguez-Cavallini et al., 2010).

Los hábitos de alimentación empiezan imitando a los de la familia, pero posteriormente éstos van evolucionando en función de las diferentes necesidades propias, ya sea por motivos sanitarios, sociales, publicitarios... Es por ello que debido a la falta de tiempo, entre otras causas, cada vez se eligen alimentos en los que el tiempo de cocinado es menor. De hecho, la revista Europea de Nutrición Clínica publicaba que en España, el consumo de procesados, se había triplicado desde el año 1990 al 2010 aumentando así hasta el 31,7%. (Latasa et al., 2018).

Esto ocurre principalmente en las grandes ciudades a causa del ritmo de vida, de la incorporación de las mujeres al mundo laboral... Lo cual ha dado lugar a que la industria alimentaria convierta los alimentos que ya están procesados (embutidos, quesos, diversos tipos de pescado ahumado, hortalizas frescas, etc.) en productos listos para el consumo, de tal forma que su tamaño se ha visto reducido ya que dichos productos se comercializan en envases. Y en otros casos son las propias grandes superficies las que se encargan de preparar raciones familiares y las envasan para su exposición y venta en vitrinas refrigeradas. (Ordóñez et al., 2007).

Este desarrollo de la industria para acomodarse a los hábitos y demandas de la sociedad del siglo XXI, ha dado lugar a la aparición de

nuevos inconvenientes como la contaminación. En estos procedimientos de troceado, loncheado, envasado, etc., es dónde aumenta el riesgo de contaminación, ya sea por los microorganismos patógenos presentes en el entorno, en los utensilios empleados o bien por las manipulaciones que se llevan a cabo. Además, en ocasiones no se puede aplicar tecnologías convencionales para la higienización de los alimentos. (Ordóñez et al., 2007).

1.1.2. *Microorganismos patógenos presentes en los alimentos*

Algunos de los microorganismos que causan enfermedades debido al consumo de alimentos contaminados son:

- *Campylobacter jejuni*: Bacilos de forma espiralada. Es uno de los principales causantes de diarreas y es considerado el principal agente de gastroenteritis en el mundo (aunque el calor y la cocción de los alimentos antes de su consumo los mata). Siendo los niños los que presentan unas tasas más altas por infección, además también puede ser mortal en individuos inmunodeprimidos y en personas de edad avanzada.
- *Clostridium*: Bacilos Gram positivos ampliamente distribuidos (López, n.d.). Dentro de este género encontramos distintas especies que causan intoxicaciones alimentarias como por ejemplo *C. botulinum* que produce una toxina botulínica que si no es diagnosticada de forma rápida podría ser mortal. Otra especie sería *C. perfringens* que causa una gastroenteritis aguda debido a que produce una enterotoxina que actúa en el intestino delgado (Lentino, 2016).
- *Escherichia coli*: Bacilo Gram negativo, no esporulado. Por lo general son inofensivas, sin embargo algunas cepas pueden muy peligrosas causando cólicos abdominales intensos, diarrea con sangre y vómitos.

- *Listeria monocytogenes*: Bacilos Gram positivos cortos, no esporulados. Ampliamente distribuidos en la naturaleza (Oteo y Alós, n.d.). Causan listeriosis, los efectos más graves serían fiebre, dolores musculares, septicemia y meningitis; por el contrario, los efectos más leves serían diarrea, dolor de cabeza, fiebre y dolores musculares.
- *Salmonella*: Enterobacteria Gram negativo. Causa salmonelosis, aunque la mayoría de los casos son leves, sin embargo, en otras ocasiones puede llegar a ser mortal. Los síntomas son fiebre, dolor abdominal, diarrea...
- *Shigella*: Enterobacteria, de forma bacilar no esporulada, inmóvil. Produce toxinas que causan inflamación del intestino delgado, úlceras en la pared intestinal y diarrea con sangre. (Green, 2014). Otros síntomas pueden ser fiebre alta, náuseas, pérdida del apetito...etc (Molina y Uribarren, 2015).
- *Staphylococcus aureus*: Cocos Gram positivos catalasa-positivos. Abarca desde problemas leves en la piel hasta endocarditis. Pudiendo producir náuseas, vómitos, diarrea, deshidratación, presión arterial baja, septicemia...; El interés actual es su resistencia a la meticilina (aislados SARM) (Camarena y Sánchez, n.d.).
- *Vibrio*: Bacilo encorvado, Gram negativo, facultativo anaerobio (González y Leyva, n.d.). Se debe al consumo de mariscos contaminados. Los síntomas en los individuos sanos son diarrea, vómitos, dolor abdominal; mientras que los individuos que presentan un mayor riesgo presentan fiebre, conmoción, lesiones cutáneas, escalofríos repentinos.
- *Bacillus cereus*: Gram positivo. Puede producir toxinas y dar lugar a dos enfermedades: una diarreica con molestias abdominales y otra caracterizada por náuseas y vómitos (síntoma emético) (López, n.d.).

1.1.3. Riesgos de los alimentos listos para el consumo

RIESGO	PROGRAMA DE CONTROL	TIPOS DE PRODUCTOS
RIESGOS BIOLÓGICOS	Riesgos biológicos (cualquier contaminación por microorganismos y/o sus toxinas)	Platos preparados, frutos secos, carne y derivados, huevos, ovoproductos, leche y derivados, horchatas...
	Biotoxinas marinas	
RIESGOS QUÍMICOS	Contaminantes en alimentos (metales pesados, estaño inorgánico, nitratos, micotoxinas...)	Frutas, hortalizas, carne y derivados, pesca y acuicultura, conservas, aceites y grasas, platos preparados, leche y derivados...
	Residuos de plaguicidas	
	Ingredientes tecnológicos (aditivos, aromas, enzimas)	
	Residuos de determinadas sustancias en productos de origen animal	
RIESGOS VINCULADOS A LA COMPOSICIÓN	Alérgenos y sustancias que provocan intolerancias	Productos alimenticios envasados, frutas, verduras, derivados de cereales...
	Alimentos biotecnológicos	
	Físico-Químico	

1.2. Métodos de seguridad alimentaria

1.2.1. Principios del sistema APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos)

El sistema de APPCC permite reconocer peligros específicos y medidas para su control cuyo propósito se basa en asegurar la inocuidad de los alimentos. Para esto, se desarrollaron siete principios:

1. Hacer un análisis de peligros: consiste en determinar los peligros que están asociados a la producción de los alimentos, es decir, desde la producción primaria hasta el lugar de consumo. Además hay que ver la probabilidad de que surjan dichos peligros y tomar medidas contra ellos.
2. Determinar los puntos críticos del control: se trata de eliminar el o los peligros, o en el caso de que no puedan ser eliminados, reducir al mínimo la posibilidad de que sucedan.
3. Establecer un límite o límites críticos: estos deben de llevarse a cabo para que los puntos críticos de control se encuentren controlados.
4. Establecer un sistema de vigilancia del control de los PCC a través de pruebas u observaciones programadas.
5. Determinar medidas correctoras que se deben de adoptar cuando la vigilancia de algún punto de control crítico no se encuentre controlado.
6. Establecer directrices de verificación para constatar que el sistema APPCC funciona correctamente.
7. Establecer un sistema de documentación sobre todos los procedimientos y los registros apropiados para estos principios y su aplicación.

1.2.2. Métodos de conservación

Conservar los alimentos implica mantener sus cualidades nutritivas durante un tiempo más o menos duradero. Existen varios métodos, los métodos primordiales encontramos el calor y el frío.

Existen otros métodos como la liofilización, deshidratación o irradiación. Dependiendo de la naturaleza de dichos procedimientos se pueden diferenciar dos métodos de conservación:

- Métodos físicos: usan factores externos no químicos para alargar la vida útil del producto. Dentro de éste método encontramos distintos tipos:
 - Limpieza mecánica: nos ayuda a eliminar aquellos componentes que contaminan el alimento y además pueden suponer una amenaza para los consumidores. Ésta técnica puede hacerse o bien mediante métodos húmedos o bien mediante métodos secos.
 - Filtración: consiste en hacer pasar a los microorganismos a través de un filtro al cual son impermeables y por tanto quedan ahí retenidos siendo eliminados.
 - Desecación: se trata de eliminar parte del agua que contiene un alimento (disminuir la actividad de agua) con el fin de aumentar la dificultad para que los microorganismos desarrollen su actividad. Esta técnica puede llevarse a cabo de diferentes formas:
 - Deshidratación convencional: consiste en evaporar el agua que presenta el alimento mediante tratamiento por calor.
 - Liofilización: se trata de una técnica que consiste en desecar el alimento mediante el vacío en estado congelado.
 - Ahumado: deshidratación empleando humo sin necesidad de que se produzca una llama.
 - Salazón: se reduce la cantidad de agua cuando se mezcla con solutos.
 - Presión: consiste en aumentar la presión osmótica de tal forma que disminuye la capacidad de los organismos para llevar a cabo sus actividades.

- Refrigeración: se trata de conservar el alimento entre 1°C y 8°C para disminuir la velocidad de la actividad de los microorganismos.
- Congelación: conservar el alimento a una temperatura inferior a 0°C con el fin de que el crecimiento bacteriano se vea interrumpido. Además, cuánto más rápido se congele un alimento más características semejantes guardan con respecto a su estado original.
- Escaldado: consiste en cocer los productos vegetales que después serán sometidos a deshidratación o bien a congelación.
- Pasteurización: tratamiento térmico que se usa para alargar la vida útil del alimento. Consiste en calentar el alimento durante 15 o 20 segundos a 72°C y enfriar después rápidamente a 4°C. Estos alimentos se mantienen únicamente unos días ya que aunque los microorganismos patógenos se eliminan, siguen teniendo lugar modificaciones físicas y bacterianas.
- Esterilización: se calientan los productos a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para eliminar toda la actividad microbiana y enzimática. Suelen tener una vida útil mayor a seis meses.
- Tratamientos con radiaciones:
 - Microondas: la fricción de las moléculas de agua del alimento generan calor aumentando así su temperatura.
 - Radiaciones infrarrojas: radiación electromagnética que producen los objetos calientes y a su vez calientan los productos que la absorben.
 - Radiaciones ultravioletas: no provocan calentamiento, sino que dan lugar a la destrucción del ADN de microorganismos.
 - Radiaciones ionizantes: provocan elementos que cambian la estructura de las membranas celulares de

los microorganismos afectando así a su actividad teniendo efectos letales sobre ellos.

- Métodos químicos: consiste en la adición de componentes químicos que aumentan la vida útil del alimento, bien porque frena su deterioro o bien porque evita el ataque de microorganismos patógenos. Para ello se usan diferentes aditivos alimentarios:
 - Conservantes: impiden o retrasan la fermentación, enmohecimiento, putrefacción y otros procesos microbiológicos.
 - Antioxidantes: inhiben o retrasan procesos de oxidación y enranciamiento.
 - Sinérgicos de antioxidantes: se emplean junto con los antioxidantes para aumentar su acción.

1.2.3. Parámetros permitidos por la legislación de seguridad alimentaria nacional

A continuación se exponen varios criterios microbiológicos de seguridad alimentaria establecidos por el Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005.

Categoría de alimentos	Microorganismos, sus toxinas y metabolitos	Plan de muestreo		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.1. Alimentos listos para el consumo destinados a los lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11 290 - 1	Productos comercializados durante su vida útil
1.2. Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11 290 - 2	Productos comercializados durante su vida útil
		5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 11 290 - 1	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido
1.3. Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes para usos médicos especiales	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11 290 - 2	Productos comercializados durante su vida útil
1.4. Carne picada y preparados de carne destinados a ser consumidos crudos	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.5. Carne picada y preparados de carne a base de carne de aves de corral destinados a ser consumidos cocinados	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.6. Carne picada y preparados de carne a base de especies distintas a las aves de corral destinados a ser consumidos cocinados	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 10 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.7. carne separada mecánicamente	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 10 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.8. Productos cárnicos destinados a ser consumidos crudos, excluidos los productos en los que el proceso de fabricación o la composición del producto elimine el riesgo de <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil

Reglamento (CE) n o 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Categoría de alimentos	Microorganismos, sus toxinas y metabolitos	Plan de muestreo		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.9. Productos cárnicos hechos a base de carne y aves de corral, destinados a ser consumidos cocinados	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.9. Productos cárnicos hechos a base de carne y aves de corral, destinados a ser consumidos cocinados 1.10. Gelatina y colágeno	<i>Salmonella</i> <i>Salmonella</i>	5 5	0 0	Ausencia en 25 g Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579 EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil Productos comercializados durante su vida útil
1.11. Quesos, mantequilla y nata a base de leche cruda o leche sometida a tratamiento térmico inferior a la pasteurización	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.12. Leche en polvo y suero en polvo	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.13. Helados, excluidos los productos en los que el proceso de fabricación o la composición del producto eliminen el riesgo de <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.14. Ovoproductos, excluidos los productos en los que el proceso de fabricación o la composición del producto eliminen el riesgo de <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.15. Alimentos listos para el consumo que contengan huevos crudos, excluidos los productos en los que el proceso de fabricación o la composición del producto eliminen el riesgo de <i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g o ml		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.16. Crustáceos y moluscos cocidos	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.17. Moluscos bivalvos vivos y equinodermos, tunicados y gasterópodos vivos	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil

Reglamento (CE) n o 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Categoría de alimentos	Microorganismos, sus toxinas y metabolitos	Plan de muestreo		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.18. Semillas germinadas (listas para el consumo)	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.19. Frutas y hortalizas troceadas (listas para el consumo)	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.20. Zumos de frutas y hortalizas no pasteurizados (listos para el consumo)	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.21. Quesos, leche en polvo y suero en polvo, tal como se contempla en los criterios para los estafilococos coagulasa positivos en el capítulo 22 del anexo	Enterotoxinas estafilocócicas	5	0	No detectado en 25 g		Método europeo de detección del LCR para estafilococos coagulasa positivos	Productos comercializados durante su vida útil
1.22. Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes menores de seis meses	<i>Salmonella</i>	30	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.23. Preparados deshidratados de continuación	<i>Salmonella</i>	30	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil
1.24. Preparados deshidratados para lactantes y alimentos dietéticos deshidratados destinados a usos médicos especiales para lactantes de menos de seis meses	<i>Cronobacter</i> spp. (<i>Enterobacter sakazakii</i>)	30	0	Ausencia en 10 g		ISO/TS 22964	Productos comercializados durante su vida útil
1.25. Moluscos bivalvos vivos y equinodermos, tunicados y gasterópodos vivos	<i>E. coli</i>	1	0	230 NPM/100g de carne y líquido intravalvar		ISO /TS 16649 - 3	Productos comercializados durante su vida útil

Reglamento (CE) n o 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Categoría de alimentos	Microorganismos, sus toxinas y metabolitos	Plan de muestreo		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
1.26. Productos de presa procedentes de especies de pescados asociados a un alto contenido en histidina	Histamina	9	2	100 mg/kg	200 mg/kg	HPLC	Productos comercializados durante su vida útil
1.27. Productos de la pesca, excepto los de la categoría de alimentos 1.27a, sometidos a tratamiento de maduración enzimática en salmuera, fabricados a partir de especies de pescados asociados a un alto contenido de histidina	Histamina	9	2	200 mg/kg	400 mg/kg	HPLC	Productos comercializados durante su vida útil
1.27a. Salsa de pescado producida por la fermentación de productos de la pesca	Histamina	1	0	400 mg/kg		HPLC	Productos comercializados durante su vida útil
1.28. Carne fresca de aves de corral	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Salmonella enteritidis</i>	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579 (para detección) y esquema White-Kaufman-Le Minor (para serotipado)	Productos comercializados durante su período de conservación
1.29. Brotes	<i>E. coli</i> productora de toxinas Shiga (STEC) O157, O26, O111, O103, O154 y O104:H4	5	0	Ausencia en 25 g		CEN/ISO TS 13136	Productos comercializados durante su período de conservación
n = número de unidades que componen la muestra; c = número de muestras que dan valores entre m y M.							

Reglamento (CE) n o 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

2. OBJETIVOS

La sociedad actual, debido a su ritmo de vida, consume una mayor cantidad de alimentos previamente cocinados, es decir, listos para consumo. Es por ello que la seguridad de los alimentos se ha convertido en una de las mayores prioridades del consumidor. Por este motivo, los objetivos del presente estudio llevado a cabo fueron los siguientes:

1. Determinar la carga microbiana total de alimentos listos para consumo.
2. Determinar la presencia de microorganismos patógenos.
3. Determinar los alimentos más propensos a la contaminación bacteriana.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Alimentos

Se han seleccionado seis alimentos en total para el análisis microbiológico de alimentos listos para el consumo.

Éstos pueden ser encontrados fácilmente en los supermercados y son, en este caso:

Nº 1: Ensalada César	Nº 2: Sándwich	Nº 3: Tortilla
		
Nº 4: Ensaladilla rusa	Nº 5: Gazpacho	Nº 6: Guacamole
		

3.2. Medios de cultivo y soluciones

Un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que posibilita el crecimiento de microorganismos. Para poder preparar dichos medios, han de tenerse unas condiciones adecuadas en el laboratorio para evitar así, cualquier contaminación que pueda impedir obtener los resultados esperados. Sobre el medio de cultivo que se ha generado, se debe sembrar las muestras que contienen los microorganismos que se van a desarrollar y multiplicar para, posteriormente, realizar un recuento de colonias (López y Torres, 2006).

- Medio Soya Triptona agar (TSA, Scharlab)

Este medio se usa para el cultivo de una gran diversidad de microorganismos. Su composición es la siguiente (Tabla 1):

Peptona de Caseína	15 g/L
Peptona de Soja	5 g/L
Sodio Cloruro	5 g/L
Agar	15 g/L
pH final: 7,3 ± 0,2	

Tabla1. Composición del medio TSA

Preparación: Suspender 24 gramos del medio TSA Agar y 3 gramos de agar en un litro de agua destilada; mezclar bien hasta que se disuelva en su totalidad. A continuación se deberá esterilizar a 120°C durante 20 minutos. Seguidamente, se atempera en un baño alrededor de 50°C, con la finalidad de obtener un medio lo suficientemente resistente y sólido para poder sembrar. Y finalmente dicho medio se verterá en placas de Petri estériles.

- Medio MacConkey Agar (Scharlab):

Este se trata de un medio selectivo y diferencial para el aislamiento de bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos a partir de muestras clínicas, agua y alimentos. De tal forma que en él se desarrollan Enterobacterias. Su composición es la siguiente (Tabla 2):

Lactosa	10 g/L
Peptonas (de carne y caseína)	3 g/L
Sales biliares	1,5 g/L
Gelatina de peptona	17 g/L
Rojo neutral	0,03 g/L
Sodio Cloruro	5 g/L
Cristal violeta	0,001 g/L
Agar	13,5 g/L

pH: 7,1 ± 0,2

Tabla 2. Composición del medio MacConkey Agar

Preparación: Suspender 28 gramos del medio MacConkey Agar y 4,5 gramos de agar en un litro de agua destilada; mezclar bien hasta que se disuelva en su totalidad. A continuación se deberá esterilizar a 120°C durante 20 minutos. Seguidamente, se atempera en un baño alrededor de 50°C, con la finalidad de obtener un medio lo suficientemente resistente y sólido para poder sembrar. Y finalmente dicho medio se verterá en placas de Petri estériles.

- Medio Baird-Parker Agar (Scharlab):

Se trata de un medio moderadamente selectivo y diferencial para el aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus*. Su composición es la siguiente (Tabla 3):

Triptona	10 g/L
Piruvato sódico	10 g/L
Glicina	12 g/L
Extracto de carne	5 g/L
Cloruro lítico	5 g/L
Extracto de levadura	1 g/L
Agar	17 g/L
pH final: 7,2 ± 0,2	

Tabla 3. Composición del medio Baird-Parker Agar

Preparación: Suspender 50,53 gramos del medio Baird-Parker Agar y 1 gramo de agar en un litro de agua destilada; mezclar bien hasta que se disuelva en su totalidad. A continuación se deberá esterilizar a 120°C durante 20 minutos. Seguidamente, se atempera en un baño alrededor de 50°C, con la finalidad de obtener un medio lo suficientemente resistente y sólido para poder sembrar. Y finalmente dicho medio se verterá en placas de Petri estériles.

- Medio Palcam Agar (Scharlab):

Se trata de un medio que permite el cultivo y aislamiento selectivo de *Listeria* spp. Su composición es la siguiente (Tabla 4):

Base de Agar Columbia	39 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
Dextrosa	0,5 g/L
Esculina	0,8 g/L
Citrato de amonio y hierro (III)	0,5 g/L
Manitol	10 g/L
Rojo fenol	0,08 g/L
Cloruro lítico	15 g/L
pH final: 7,2 ± 0,2	

Tabla 4. Composición del medio Palcam Agar

Preparación: Suspender 34,6 gramos del medio Palcam Agar en un litro de agua destilada; mezclar bien hasta que se disuelva en su totalidad. A continuación se deberá esterilizar a 120°C durante 20 minutos. Seguidamente, se atempera en un baño alrededor de 50°C, con la finalidad de obtener un medio lo suficientemente resistente y sólido para poder sembrar. Y finalmente dicho medio se verterá en placas de Petri estériles.

- Medio XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato) Agar (Scharlab):

Es un medio moderadamente selectivo y diferencial para el aislamiento y la diferenciación de *Salmonella* y *Shigella* (patógenos entéricos Gram negativos). Su composición es la siguiente (Tabla 5):

Amino hierro (III) citrato	0,8 g/L
Extracto de levadura	3 g/L
Lactosa	7,5 g/L

L-Lisina	5 g/L
Rojo de Fenol	0,08 g/L
Sacarosa	7,5 g/L
Sodio Cloruro	5 g/L
Sodio Desoxicolato	2,5 g/L
Sodio Tiosulfato	6,8 g/L
D(+)-Xilosa	3,5 g/L
Agar	13,5 g/L
pH: 7,4 ± 0,2	

Tabla 5. Composición del medio XLD Agar

Preparación: Suspender 43,35 gramos del medio XLD Agar y 4,5 gramos de agar en un litro de agua destilada; mezclar bien hasta que se disuelva en su totalidad. A continuación se deberá esterilizar a 120°C durante 20 minutos. Seguidamente, se atempera en un baño alrededor de 50°C, con la finalidad de obtener un medio lo suficientemente resistente y sólido para poder sembrar. Y finalmente dicho medio se verterá en placas de Petri estériles.

- KAA (Kanamicina, Esculina, Azida) Agar (Scharlab):

Se trata de un medio de cultivo para el aislamiento e identificación de Enterococos y por tanto la confirmación de su presencia en la muestra. Su composición es la siguiente (Tabla 6):

Triptona	20 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Citrato de disodio	1 g/L
Esculina	1 g/L
Citrato de amonio-férrico	0,5 g/L

Sodio acido	0,15 g/L
Sulfato de kanamicina	0,02 g/L
Agar	15 g/L
pH final: 7,0 ± 0,2	

Tabla 6. Composición del medio KAA Agar

Preparación: Suspender 26,4 gramos del medio KAA Agar y 3 gramos de agar en un litro de agua destilada; mezclar bien hasta que se disuelva en su totalidad. A continuación se deberá esterilizar a 120°C durante 20 minutos. Seguidamente, se atempera en un baño alrededor de 50°C, con la finalidad de obtener un medio lo suficientemente resistente y sólido para poder sembrar. Y finalmente dicho medio se verterá en placas de Petri estériles.

- Medio *Bacillus cereus* Agar (Scharlab):

Se trata de un medio utilizado para el aislamiento y recuento de *Bacillus cereus*. Su composición es la siguiente:

Peptona	10 g/L
Manitol	10 g/L
Cloruro de sodio	10 g/L
Extracto de carne	1 g/L
Rojo fenol	0,025 g/L
Agar	15 g/L
pH final: 7,2 ± 0,2	

Tabla 7. Composición del medio *Bacillus cereus*

Preparación: Suspender 40,9 gramos del medio *Bacillus cereus* y 3 gramos de agar en un litro de agua destilada; mezclar bien hasta que se disuelva en su totalidad. A continuación se deberá esterilizar a 120°C durante 20 minutos. Seguidamente, se atempera en un baño alrededor de 50°C, con la finalidad de obtener un medio lo suficientemente resistente y sólido para

poder sembrar. Y finalmente dicho medio se verterá en placas de Petri estériles.

- Solución salina al 0,85%:

La solución salina al 0,85% sirve como diluyente para la preparación de las diluciones seriadas de los alimentos antes de proceder a su siembra en los diferentes de cultivo. Para ello, se prepara añadiendo 0,85 g de cloruro sódico a 100 ml de Agua destilada y a continuación se esterilizará en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

3.3. Material de laboratorio empleado

Matraces estériles de diferentes tamaños	Guantes
Placas de Petri estériles	Alcohol de 96°
Pipetas de 1000 µl y 100 µl	Asa de Drigalsky
Autoclave	Asa de siembra
Agua destilada	Baño María a 50°C
Mechero Bunsen	Tubos eppendorf
Estufa de cultivo a 37°C	Lugol
Puntas estériles para micropipetas	Safranina
Etanol	Cristal violeta
Microscopio	Aceite de inmersión
Stomacher	Portaobjetos

3.4. Determinación de patógenos y carga microbiana total

Antes de empezar el proceso, es necesario que todos y cada uno de los pasos realizados en microbiología se lleven a cabo cerca del mechero Bunsen para evitar la contaminación de las muestras. Además de que el material utilizado debe de estar esterilizado con anterioridad en el autoclave.

Para comenzar se prepararon seis bolsas de Stomacher, a cada una se le añade 5 gramos del alimento elegido y 45 ml de la solución salina estéril. Para evitar la contaminación y asegurar la esterilidad, la preparación de estas 6 bolsas se realiza cerca del mechero Bunsen. A continuación, una vez preparadas, se cierran herméticamente y se meten en el Stomacher para la disgregación mecánica del alimento y obtener así, una suspensión homogeneizada de forma rápida (suspensión madre). Seguidamente, se prepararon las diluciones seriadas de las muestras de los alimentos, desde la muestra madre (en este caso la bolsa de Stomacher) hasta la dilución 10^{-6} . Aproximadamente se prepararon 72 tubos eppendorf con 900 μ l de solución salina estéril cada uno, partiendo de la suspensión madre, diluida a 10^{-1} . De la suspensión madre hemos tomado 100 μ l, los cuales se añaden a nuestro tubo eppendorf y se mezcla. Así obtendremos la solución 10^{-2} . Y así hasta llegar a la dilución correspondiente necesaria para cada una de las muestras de alimentos (Figura X).

Una vez que se han obtenido todas las diluciones de las 6 muestras de alimentos, lo que hay que llevar a cabo es la inoculación de cada una de las diluciones en las placas de Petri de los siete medios de cultivo distintos (Figura X). Para inocularlas se debe añadir 100 μ l en cada una de ellas y con el asa de Drigalsky (la cual debe flamearse primero con alcohol de 96°) se extiende la muestra sobre la superficie de la placa. Para que los resultados sean adecuados y correctos hay que sembrar dos placas por cada dilución obteniéndose así la media de los recuentos posteriores. Una vez concluido este paso se pondrán las placas en la estufa a 37°C dejándolas incubar durante 48 horas. Para incubar las placas debe de realizarse con la base de éstas hacia arriba.

Transcurrido ese tiempo, se procede al recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), conociéndose así el número de células viables que existen en el alimento analizado.

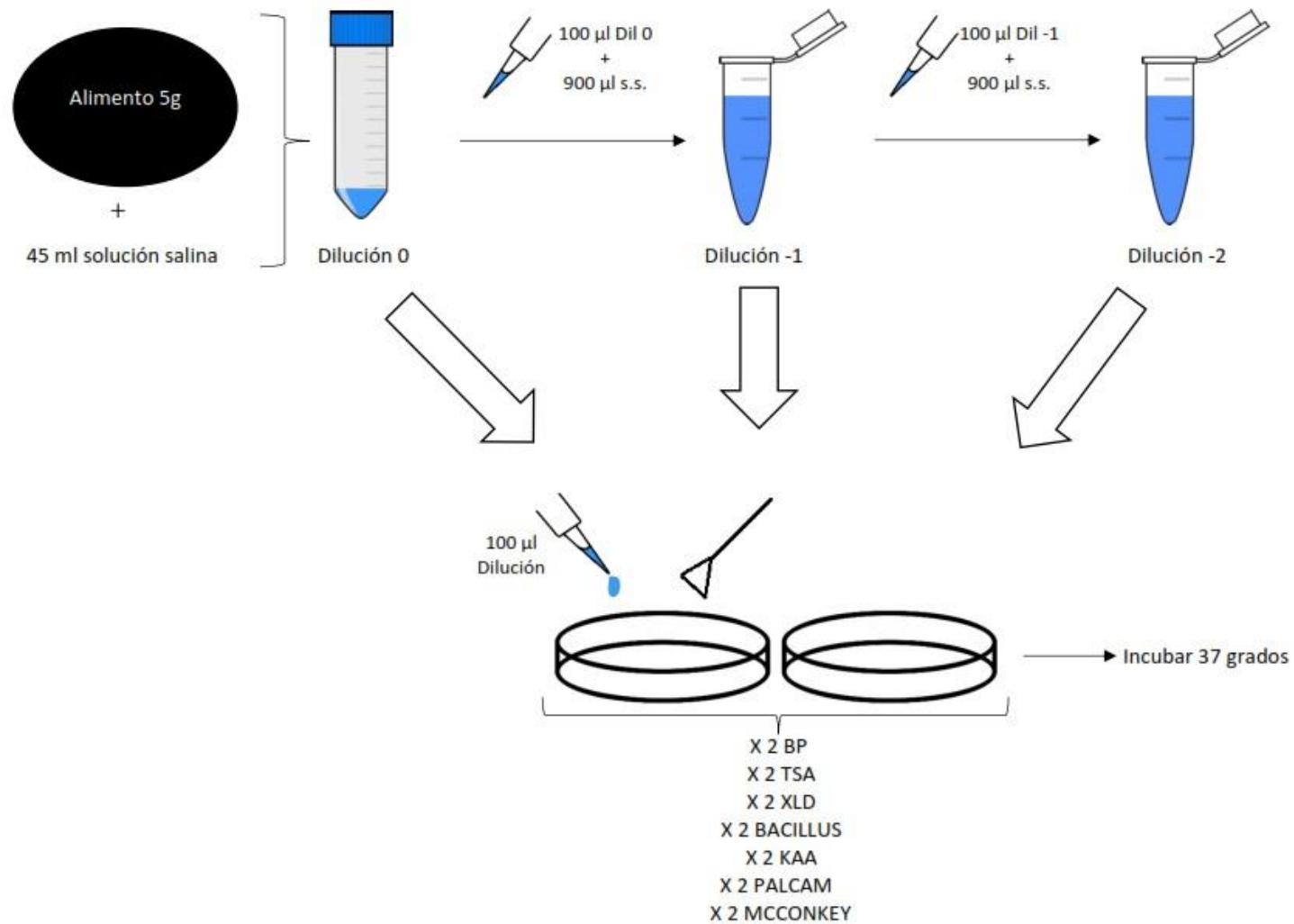


Figura X. Descripción del proceso de preparación de las diluciones del alimento y su siembra en los diferentes medios de cultivo.

3.5. Tinción diferencial de Gram

La tinción de Gram es de gran utilidad en laboratorios donde se manejan pruebas microbiológicas. Sigue siendo de las más utilizadas debido a que resulta muy sencilla y eficaz. Es tan importante porque nos permite diferenciar las bacterias en función de la estructura y el grosor de la pared bacteriana. Las Gram negativas están formadas por una delgada capa de peptidoglicano y además presenta una membrana celular externa. Por otro lado, las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida también por peptidoglicano pero, a diferencia de las otras no presentan una membrana celular externa. Es por estas diferencias que se determinan las características tintoriales (López et al., 2014).

El procedimiento de esta técnica consiste en depositar una gota de agua destilada en el portaobjetos y sobre ella extender el cultivo bacteriano con el asa de siembra y fijarlo con calor. Se debe dejar secar y enfriar. Una vez fría, el primer paso que habría que realizar sería aplicar el colorante cristal violeta (éste tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana (López et al., 2014)) y dejar actuar durante dos minutos (Figura XX). Pasado ese tiempo se escurre el sobrenadante y se lava con agua destilada. A continuación, se añade el Lugol (éste dificulta la salida del cristal violeta de ambos tipos de células por la formación de un complejo que satura los espacios del peptidoglicano de la pared bacteriana, pero es más fácil extraerlo de las Gram negativas por tener menos peptidoglicano (López et al., 2014)) y se deja actuar también durante dos minutos. Pasados esos dos minutos, se vuelve a lavar con agua destilada y se procede a la decoloración o deshidratación con etanol durante 30 segundos; así se consigue que las bacterias Gram positivas retengan el Cristal violeta, mientras que las bacterias Gram negativas lo pierdan. Transcurridos los 30 segundos se lava de nuevo para eliminar el exceso de etanol. Por último se añade la Safranina, (tratándose éste de un colorante de contraste que penetra en el citoplasma de los microorganismos Gram negativos) y se deja actuar durante otros dos minutos. Pasados éstos dos minutos y para terminar con la técnica, se elimina el sobrenadante con agua, se deja secar y pasamos a la observación de las muestras al

microscopio con el objetivo de 100X (para poder llevar a cabo dicha observación se necesitará el uso de aceite de inmersión).

Además, hay que tener en cuenta que un elevado grado de decoloración puede influir en el color con el que se observan las bacterias Gram positivas, viéndose rosadas en lugar de violetas. También se debe tener cierto cuidado al lavar con agua destilada después de cada colorante, ya que un excesivo lavado puede dar lugar a la dilución de los reactivos y, por tanto, la tinción no se producirá de forma correcta.

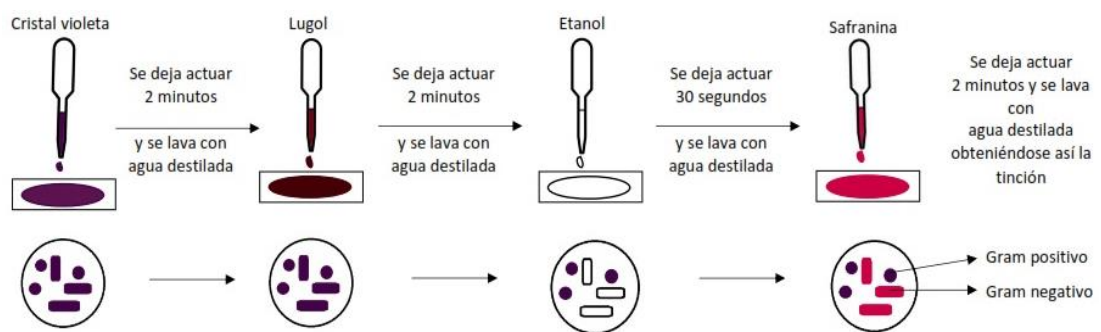


Figura XX. Descripción del proceso de tinción de Gram.

4. RESULTADOS

4.1. Determinación de la carga microbiana en los alimentos listos para el consumo

La determinación de la carga microbiana consiste en contar las colonias que hay en los diferentes medios de cultivo que se han empleado. Para poder realizar esto se usa la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \frac{UFC}{ml} = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias} \times \text{Factor de Dilución}}{\text{Volumen (ml)}}$$

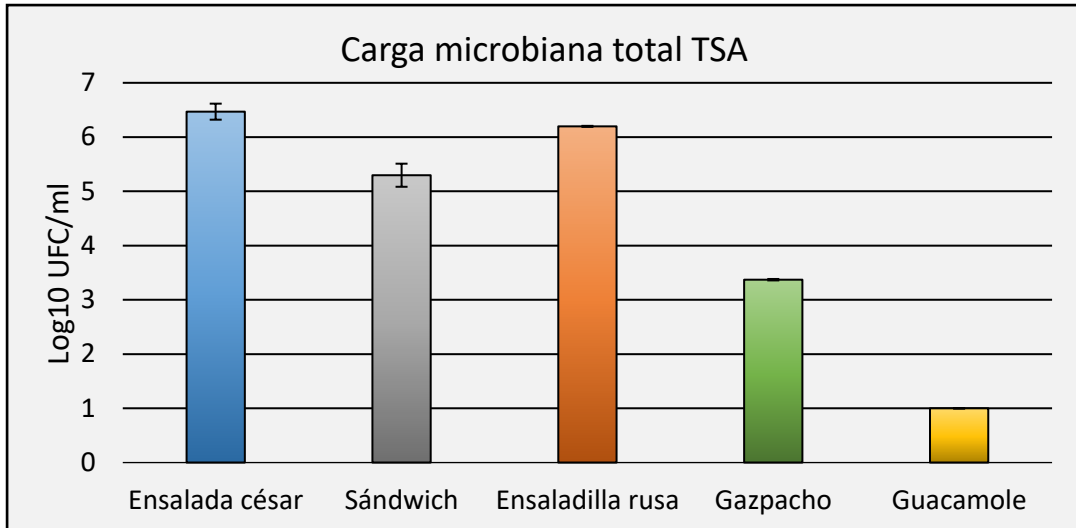
Una vez realizadas las enumeraciones, se pueden observar los resultados obtenidos en la siguiente tabla:

Medios de cultivo	Recuentos en Log ₁₀ UFC/ml de los diferentes alimentos					
	Ensalada César	Sándwich	Tortilla	Ensaladilla rusa	Gazpacho	Guacamole
TSA	6,468	5,297	0	6,197	3,371	1
MacConkey	6,073	1	0	1	1	1
Braid-Parker	1	1	0	5,481	2	2,651
Palcam	1	1	0	1	3,057	3,369
XLD	6,496	1	0	2,452	1	1
KAA	2	1	0	1	1	1
<i>B. cereus</i>	3,414	7,249	0	1	2,952	3,355

Tabla 8. Resumen de UFC/ml (en escala logarítmica en base 10) de la carga microbiana en los diferentes medios de cultivo empleados en cada alimento.

4.1.1. Carga microbiana total (TSA)

En la siguiente gráfica se muestra la carga microbiana total de todos los alimentos en el medio general TSA a excepción de la tortilla, en la que no se detectó la presencia de microorganismos.

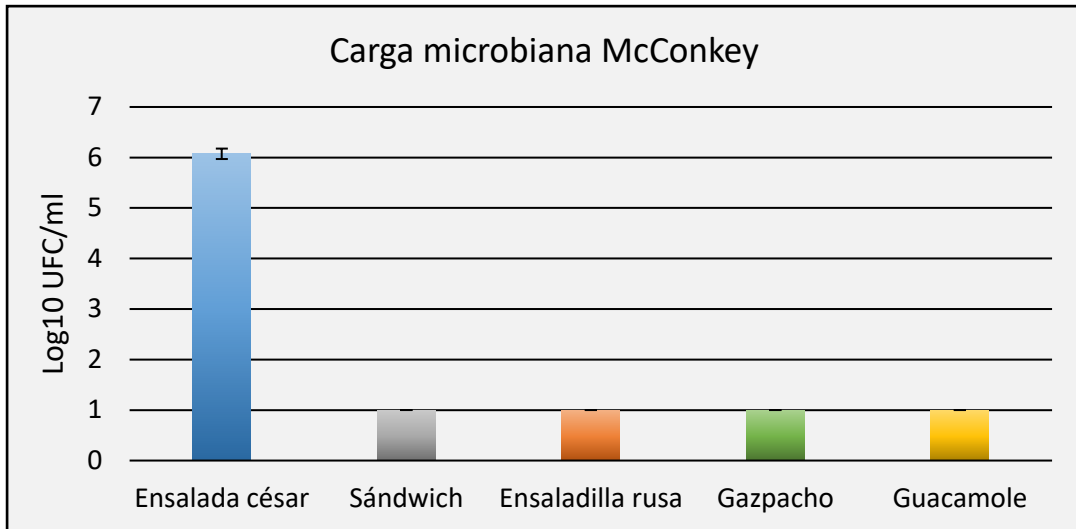


Gráfica 1. Carga microbiana total en el medio general TSA

Como se puede observar, la ensalada César y la ensaladilla rusa son los alimentos listos para el consumo que más carga microbiana presentan, mientras que, por el contrario, el guacamole, junto con la tortilla (no representada ya que presenta ausencia de microorganismos) son los alimentos que menos microorganismos contienen.

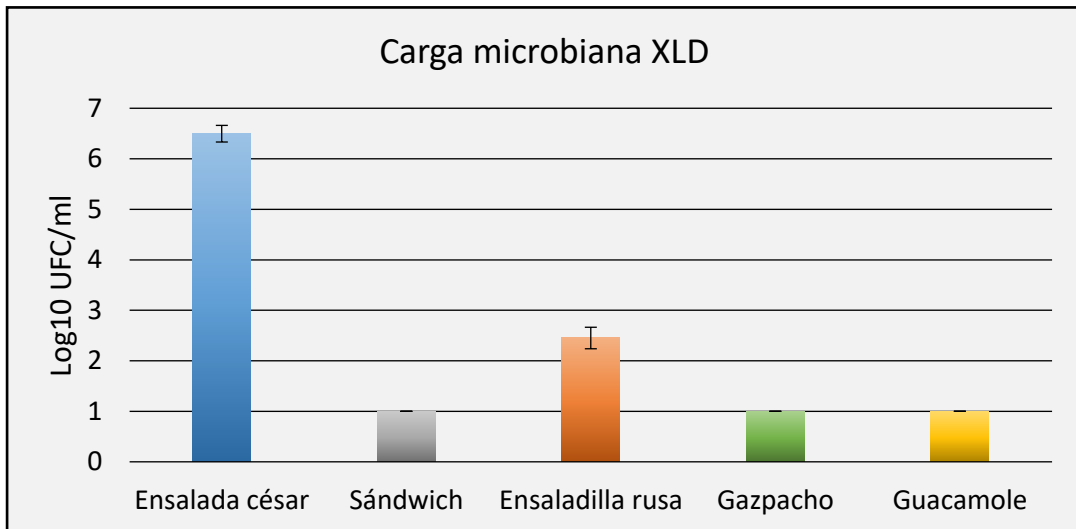
4.1.2. Detección de patógenos en medios selectivos

A continuación se muestra una gráfica más detallada por cada tipo de medio selectivo usado y en la que se incluyen todos los alimentos que presentaron patógenos en ese medio. A excepción de la tortilla, en la que no se detectó ningún microorganismo en ninguno de los medios.



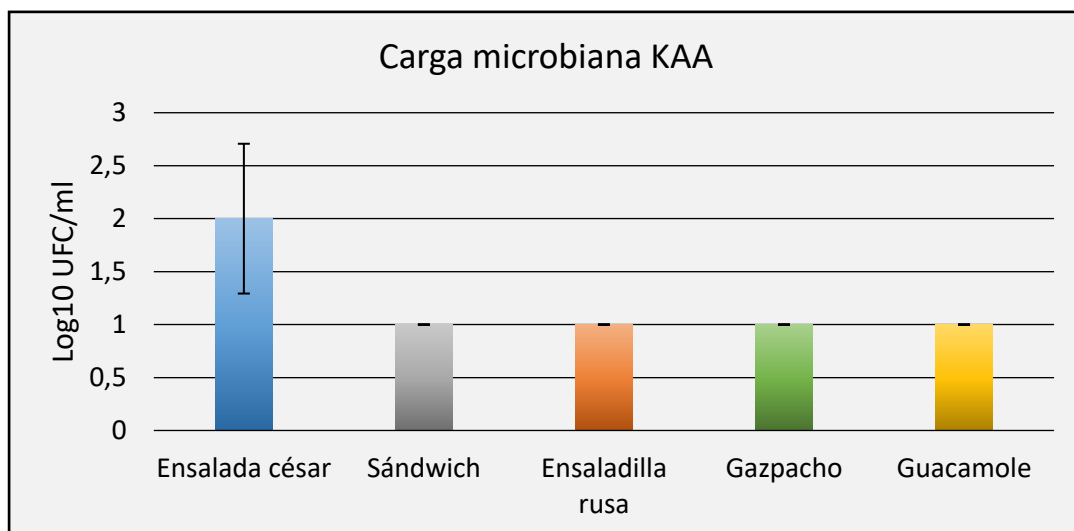
Gráfica 2. Detección y cuantificación de enterobacterias en el medio agar McConkey

En este caso, el alimento que presentó una mayor carga de enterobacterias ha sido la ensalada César.



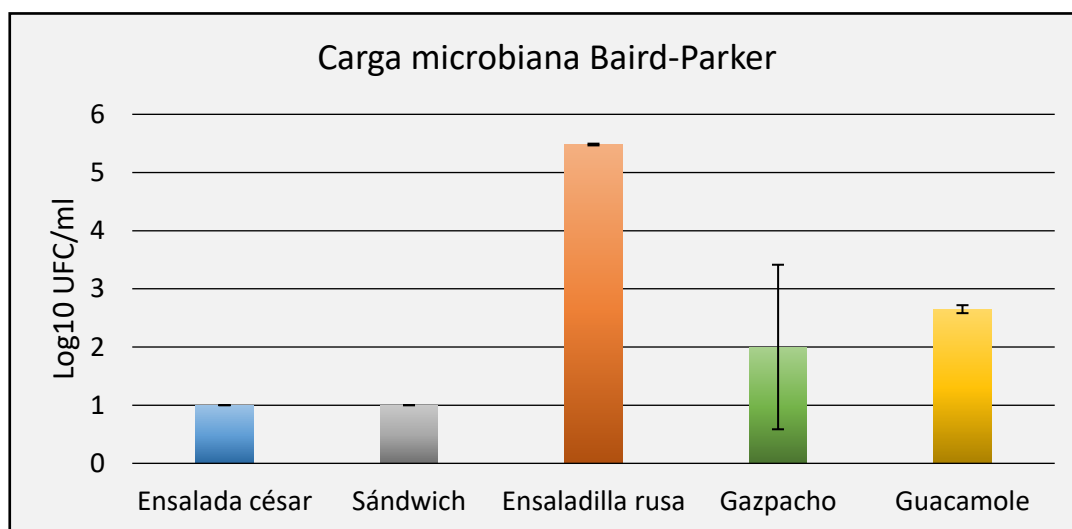
Gráfica 3. Detección y cuantificación de *Salmonella* sp. En el medio agar XLD.

Como podemos observar, *Salmonella* sp. Fue detectada en mayor cantidad en la ensalada César y en la ensaladilla rusa, aunque con más cantidad en la primera



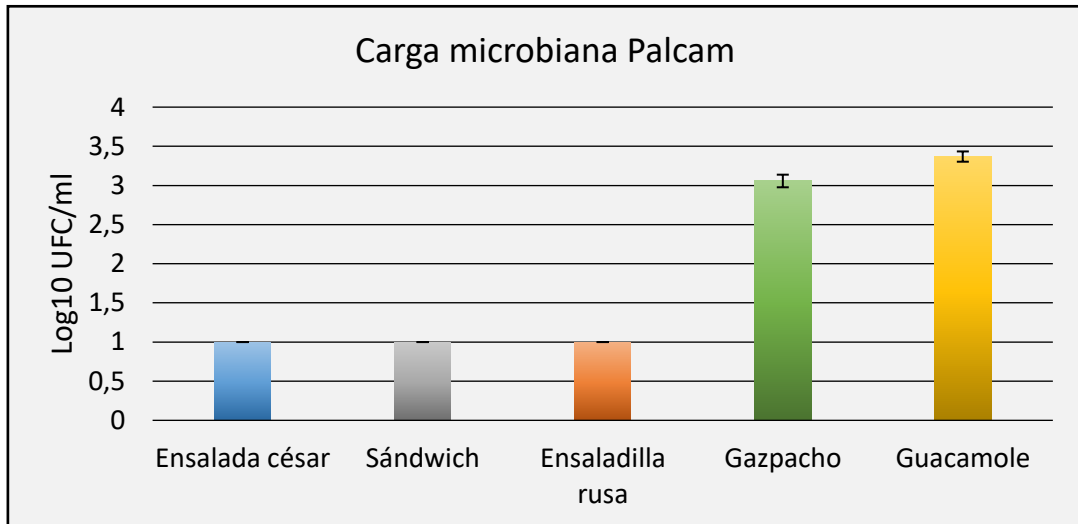
Gráfica 4. Detección y cuantificación de enterococos en el medio KAA

Igual que en los anteriores casos, podemos ver que la ensalada César fue el alimento con mayor carga microbiana de enterococos.



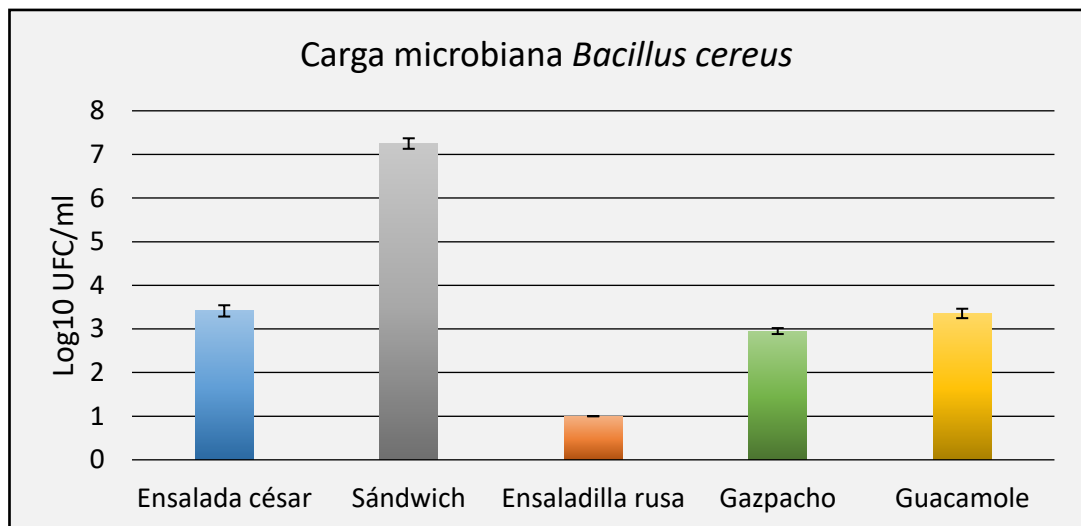
Gráfica 5. Detección y cuantificación de *Staphylococcus aureus* en el medio agar Baird-Parker

En este caso, los alimentos que más carga de *S. aureus* presentaron fueron la ensaladilla rusa (siendo éste el que más carga presenta), el guacamole y el gazpacho.



Gráfica 6. Detección y cuantificación de *Listeria* sp. En el medio agar Palcam

Para este medio selectivo, observamos que tanto el gazpacho como el guacamole presentan mayor carga microbiana de *Listeria* sp., siendo más importante en el guacamole.



Gráfica 7. Detección y cuantificación de *Bacillus cereus* en el medio agar-*Bacillus cereus*

Para éste último medio selectivo, el sándwich fue el alimento con mayor carga microbiana presentada, seguido de la ensalada César, guacamole y gazpacho de mayor a menor carga microbiana respectivamente.

4.2. Identificación preliminar de los microorganismos detectados en medios selectivos

Las colonias de Enterobacterias (medio MacConkey) se detectaron sólo en la ensalada César, con una media a escala logarítmica en base 10 de 6,073 UFC/ml (ver tabla 8).

Las colonias de *Staphylococcus aureus* (medio Baird-Parker) se detectaron en la ensaladilla rusa, en el gazpacho y en el guacamole (Fig. 1). Siendo en el primero de éstos dónde se encontraron las bacterias en mayor cantidad, con una media a escala logarítmica en base 10 de 5,481 UFC/ml (ver tabla 8).

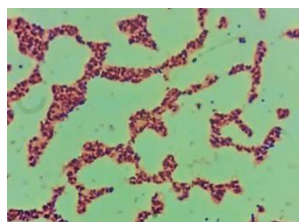


Fig.1. Observación de las colonias de *Staphylococcus aureus* tras la tinción de Gram. Microscopía óptica x 100.

Las colonias de *Listeria monocytogenes* (medio Palcam) se observaron en el gazpacho y el guacamole (Fig. 2). En éste último es donde se encontraron mayor cantidad de colonias, con una media a escala logarítmica en base 10 de 3,369 UFC/ml (ver tabla 8).



Fig.2. Observación de las colonias de *Listeria monocytogenes* tras la tinción de Gram. Microscopía óptica x 100.

Las colonias de *Salmonella* y *Shigella* (medio XLD) se detectaron en dos alimentos distintos, siendo éstos la ensalada César y la ensaladilla rusa (Fig. 3). Siendo el primer alimento el que mayor número de bacterias presenta, con una media a escala logarítmica en base 10 de 6,496 UFC/ml (ver tabla 8).

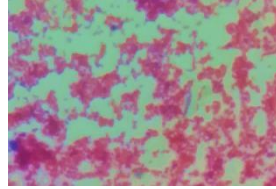


Fig.3. Colonias de *Salmonella* obtenidas a partir de la tinción de Gram. Microscopía óptica x 100.

Las colonias de Enterococos (medio KAA) se detectaron únicamente en la ensalada César (Fig. 4) con una media a escala logarítmica en base 10 de 2 UFC/ml (ver tabla 8).

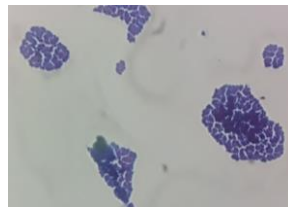


Fig.4. Observación de las colonias de Enterococos obtenidas tras la tinción de Gram. Microscopía óptica x 100.

Las colonias de *Bacillus cereus* (medio agar-*B. cereus*) se observaron en la ensalada César, en el sándwich, gazpacho y guacamole (Fig. 5). Siendo el sándwich el alimento que mayor cantidad de bacterias presentaba, con una media a escala logarítmica en base 10 de 7,249 UFC/ml (ver tabla 8).

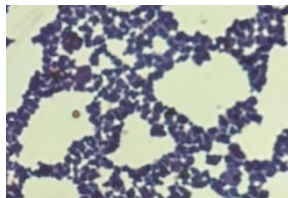


Fig.5. Observación de las colonias de *Bacillus cereus* tras la tinción de Gram. Microscopía óptica x 100.

5. DISCUSIÓN

La infección y las intoxicaciones alimentarias se tratan de enfermedades que normalmente son leves pero, en determinadas ocasiones pueden dar lugar a la muerte. Esto ocurre cuando se ingieren alimentos o bebidas contaminadas por bacterias o toxinas y puede afectar a una sola persona o a un grupo de personas a la vez. De tal forma que, cuanto mayor es el número de bacterias presentes, mayor es la probabilidad de infección y enfermedad. Es por ello que en este caso nos centraremos en las bacterias que se han encontrado en la ensalada César, ensaladilla rusa y guacamole.

Según la Organización Mundial de la Salud, *Escherichia coli* (Enterobacteria) se transmite sobre todo por el consumo de alimentos contaminados, como carne cruda o poco cocida, leche cruda, etc., produciendo síntomas destacados como la diarrea y calambres abdominales. Un artículo publicado en El País, expone que en el año 2011 en el norte de Alemania se produjo 17 muertes y en Suecia una debido a un brote de *E. coli*. Además, el periódico La Vanguardia también publicó que en ese mismo año, en Francia, se confirmó un nuevo brote procedente de carne picada, en el cual se ingresaron a 8 niños en el Hospital Universitario de Lille por síndrome urémico hemolítico.

En el caso de la presencia de *Staphylococcus aureus*, (el cual es sensible a las temperaturas, inactivándose a una temperatura baja) en cantidades elevadas puede deberse, en general, a la manipulación de los alimentos. La presencia de esta bacteria en los alimentos junto con la presencia de ésta en nuestra piel, hace que las condiciones con las que se manipula el alimento sean higiénicamente insuficientes. Además, se considera el principal causante de las infecciones intrahospitalarias hoy en día. Según el "British Medical Journal" investigadores del Public Health Laboratory Service (PHLS), registraron 1591 muertes en el año 1998 causadas por *S. aureus*, incluyendo 398 de cepas resistentes a antibióticos.

En cuanto a la presencia de *Listeria monocytogenes*, actualmente se considera uno de los principales agentes de enfermedades de contaminación alimentaria. De hecho, en marzo de 2015 fue incluida como enfermedad de declaración obligatoria.

En Europa continua siendo una enfermedad poco frecuente, en 2011 se daban 0,32 casos por cada 100000 personas afectadas. Sin embargo, la mortalidad puede ser entre 25 y 30%. Mientras que en Estados Unidos, la incidencia fue de 0,29 casos de 100.000 personas con un 31% de mortalidad. Sin embargo, según los datos de la Unión Europea, la tasa de hospitalización sí es muy elevada, siendo ésta del 93,6% (Sánchez, 2016). Además, en Australia el año pasado murieron al menos tres personas y otras doce enfermaron por consumo de melones contaminados, mientras que en Sudáfrica un brote dio lugar a 170 muertes, según indicó el Instituto Nacional de Enfermedades Contagiosas.

Las colonias de *Salmonella* y *Shigella*, según la Organización Mundial de Salud, son una de las cuatro causas principales de enfermedades diarreicas, aunque la mayoría de los efectos son leves en ocasiones puede llegar a ser mortal. De hecho, una noticia publicada en el periódico El País, indica que en 2017 al menos 25 bebés se infectaron con salmonelosis tras consumir leche infantil en mal estado. Y, además, otro artículo del periódico El País informó en 2016 de unas intoxicaciones producidas en Cádiz, España, por el consumo de tortilla. Probablemente contaminada por su mala manipulación y la deficiencia higiénica del lugar, llegando a intoxicar a 112 personas.

Las colonias de Enterococos pueden encontrarse en los alimentos debido a que pueden sobrevivir a los tratamientos a los que se someten. Esto se debe a que tienen una elevada resistencia a las condiciones adversas. Además, el Sistema Nacional de Vigilancia de las Infecciones Nosocomiales de Estados Unidos (NNIS) indica que son el tercera motivo de infecciones nosocomiales y además expone que son responsables de más del 10% de las infecciones producidas en los hospitales (Díaz et al., 2010).

En el caso de *Bacillus cereus*, puede producir dos enfermedades: una diarreica con molestias abdominales y otra caracterizada por náuseas y vómitos (síntoma emético). Ésta bacteria se encuentra esencialmente en el arroz y en las sobras y además puede transmitirse a través de alimentos que han sido mantenidos a temperatura ambiente durante un tiempo prolongado.

De tal forma que una de las mejores opciones para prevenir aquellas enfermedades que se transmiten por los alimentos es llevando a cabo una buena higiene, ya que la mayor parte de las intoxicaciones proceden de una deficiencia en ello. De hecho, la Organización Mundial de la Salud nos proporciona cinco claves para llevarlo a cabo:

1. Mantener la limpieza: hay que tener siempre las manos limpias y las superficies y equipos que se van a usar desinfectados. Además hay que proteger los alimentos y las áreas de cocina de insectos, plagas, etc.
2. Separar los alimentos crudos de los cocinados: hay que utilizar utensilios y equipos diferentes para la manipulación y además hay que conservarlos en diferentes recipientes.
3. Cocinar completamente: hay que asegurarse de que los alimentos están completamente cocinados (por ejemplo, en el caso de la carne hay que asegurarse de que el jugo es claro y no rosado) y hay que recalentarlos antes de consumirlos.
4. Mantener los alimentos a temperaturas seguras: los alimentos cocinados no pueden estar a temperatura ambiente más de dos horas, no se pueden descongelar a temperatura ambiente, hay que servir la comida muy caliente, etc.
5. Uso de agua y materias primas: hay que lavar la fruta, verdura y hortalizas antes de su consumo; elegir alimentos que hayan sido procesados para evitar su contaminación y asegurar su inocuidad...

6. CONCLUSIONES

Tras observar los resultados obtenidos, podemos concluir que la ensalada César, la ensaladilla rusa y el guacamole presentan una cantidad elevada de bacterias, pudiendo producir infecciones o intoxicaciones graves o incluso, en algunas ocasiones pudiendo producir la muerte.

La bacteria que más causas de infección y por ende, de hospitalización, e incluso muerte, ha sido *Staphylococcus aureus*. Este patógeno se encuentra en mayor cantidad en la ensaladilla rusa.

La ensaladilla rusa se trata de un alimento listo para el consumo. Éste lo podemos encontrar en cualquier vitrina de los supermercados, por lo que su adquisición es habitual. Por lo que su alto contenido en *Staphylococcus aureus* puede deberse a la mala manipulación durante su producción o bien la falta de higiene de los utensilios empleados en su elaboración.

También cabe destacar las hospitalizaciones causadas por *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, entre otras, en los alimentos listos para el consumo. Incluso produciendo la muerte como es el caso de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, siendo éste último patógeno, de ambos, el que más muertes ha causado.

Por lo que, para concluir, es necesario llevar a cabo un correcto seguimiento sobre las normas de higiene, además de su adecuado almacenamiento, para poder reducir las hospitalizaciones o incluso la muerte que tienen lugar por la presencia de bacterias patógenas en los alimentos listos para el consumo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- BELMONTE A., 2015. Análisis microbiológico de aguas de distintas fuentes públicas. Trabajo fin de grado. Universidad de Jaén. pp. 26.
- CAMARENA J.; SÁNCHEZ R., Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Doctor Peset. Valencia. pp. 1.
- DIAZ M.; RODRÍGUEZ C.; ZHURBENKO R., 2010. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 48 (2): pp. 147 – 148.
- El sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC). Sistemas de calidad e inocuidad de los alimentos Manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC). 2002. Roma: , pp. 132-133.
- GONZÁLEZ M^a I.; LEYVA V. Identificación de especies del género *Vibrio* aisladas de aguas costeras. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, Cuba. pp. 1.
- IPSA, Instituto de Salud Pública Seguridad Alimentaria. 2011. Guía de muestreo e interpretación de resultados analíticos de productos alimenticios. Edición 1. Madrid. pp. 5.
- La conservación de los alimentos. Manipulación de Alimentos (Manual Común). Junta de Andalucía, Servicio Andaluz de Empleo, Consejería de Empleo y Desarrollo Tecnológico, pp. 64-70.
- LATASA P.; LOUZADA M.L.D.C.; MARTÍNEZ E.; MONTEIRO C.A., 2018. Added sugars and ultra-processed foods in Spanish households (1990–2010). European Journal of Clinical Nutrition. 72, pp. 1404–1412.
- LÓPEZ C.; MARTÍN J.; DEL REAL A., 2003. La Seguridad Alimentaria en la Educación Secundaria Obligatoria. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid. pp. 9.

- LÓPEZ L.; HERNÁNDEZ M.; COLÍN C.A.; ORTEGA S.; CERÓN G.; FRANCO R., 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. 3 (1): pp. 12 – 13.
- LÓPEZ L.; TORRES C. (2006). Trabajo práctico nº 4: Medios de cultivo. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de agroindustrias. Microbiología General. Farmacia. pp. 1.
- MOLINA J.; URIBARREN T., 2015. Infecciones por Shigella spp. Departamento de microbiología y parasitología – Recursos en bacteriología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ORDÓÑEZ, JA.; CAMBERO, I.; CABEZA, M.C. y DE LA HOZ, L. 2007. Higienización de los alimentos listos para su consumo (RTE) mediante radiaciones ionizantes. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. 28040-Madrid. pp. 1 – 3.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos. Departamento de inocuidad de los alimentos, zoonosis y enfermedades de transmisión alimentaria. pp. 12 – 21.
- OTEO J.; ALÓS J.A., Listeria y listeriosis. Servicio de Microbiología. Hospital de Móstoles. Móstoles. Madrid. pp. 1.
- Reglamento (CE) n o 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- RODRÍGUEZ-CAVALLINI E.; RODRÍGUEZ C.; GAMBOA Mª M.; ARIAS MªL., 2010. Evaluación microbiológica de alimentos listos para el consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses. Trabajo de investigación. 60 (2): pp. 179.
- SÁNCHEZ F.J., 2016. Listeria monocytogenes: un reto para la seguridad alimentaria. Laboratorio Salud Pública de Salamanca. ISSN electrónico 2445-1355. 1(2): pp. 160 – 161.

Páginas web:

Agar de Soja Trípico. pp. 1.

http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a297bfd85301.pdf

Bacillus cereus Selectivo Agar. pp. 1.

http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2818a041dc6.pdf

DE BENITO E.; GÓMEZ J., 2011. Una bacteria nueva causó el brote de Alemania.

https://elpais.com/diario/2011/06/03/sociedad/1307052002_850215.html

Escherichia Coli: características, patogenicidad y prevención (I), 2016.

<http://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>

GREEN N., 2014. Infecciones por Shigella.

<https://kidshealth.org/es/parents/shigella-esp.html>

Intoxicación alimentaria, 2008. pp. 1.

https://www.nhs.uk/translationspanish/Documents/Food_Poisoning_Spanish_FINAL.pdf

Francia confirma un nuevo brote de *E. coli* procedente de carne picada, 2011.

<https://www.lavanguardia.com/salud/20110621/54174363907/francia-confirma-un-nuevo-brote-de-e-coli-procedente-de-carne-picada.html>

LENTINO J.R., 2016. Intoxicación alimentaria por *Clostridium perfringens*.

<https://www.msdmanuals.com/es-es/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-anaerobias/intoxicaci%C3%B3n-alimentaria-por-clostridium-perfringens>

LÓPEZ B. *Bacillus cereus*: taxonomía, características, morfología, hábitat.

<https://www.lifeder.com/bacillus-cereus/>

LÓPEZ B. *Clostridium*: características, taxonomía, morfología, hábitat.

<https://www.lifeder.com/clostridium/>

Mac Conkey Agar. pp. 1.

https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2ed674cf661.pdf

Mueren tres personas y otras 12 están enfermas por un brote de listeria en Australia, 2018.

<https://www.europapress.es/internacional/noticia-mueren-tres-personas-otras-12-estan-enfermas-brote-listeria-australia-20180303043554.html>

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2018. Botulismo.

<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/botulism>

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2018. Campylobacter.

<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2018. Escherichia Coli.

<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2018. Listeriosis.

<https://www.who.int/mediacentre/factsheets/listeriosis/es/>

Organización Mundial de la Salud (OMS), 2018. Salmonella (no tifoidea).

[https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))

Retirados del mercado 30 lotes de leche infantil tras los casos de Salmonella en Francia, 2017.

https://elpais.com/politica/2017/12/11/actualidad/1513008640_036959.html

Staphylococcus Aureus y la manipulación de alimentos. Manipulador de Alimentos, 2018.

<https://manipulador-de-alimentos.com/staphylococcus-aureus-y-la-manipulacion-de-alimentos/>

Una tortilla “altamente contaminada” causa de las intoxicaciones en Cádiz, 2016.

https://elpais.com/politica/2016/02/12/actualidad/1455293498_876125.html

¿Qué es APPCC?

https://eqa.es/presentaciones/APPCC_ficha_de_producto.pdf

E. coli

<https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/e-coli/symptoms-causes/syc-20372058>

Bacillus cereus

<https://espanol.foodsafety.gov/intoxicaci%C3%B3n/causas/bacteriasvirus/bcereus/xki/%C3%ADndice.html>

Infecciones por *Vibrio*

<https://espanol.foodsafety.gov/intoxicaci%C3%B3n/causas/bacteriasvirus/infecciones-por-vibrio/xjk/%C3%ADndice.html>

Infecciones por estafilococos

<https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/staph-infections/symptoms-causes/syc-20356221>

BD Baird – Parker Agar

<https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-255084.pdf>

BD XLD Agar (Xylose-Lysina-Desoxycholate Agar)

<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8783>

BD Palcam *Listeria* Agar

<https://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-254539.pdf>