

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE INGENIERÍA**

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**“CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE ENSALADAS ELABORADAS EN POLLERÍAS
DEL CENTRO POBLADO LAS AMÉRICAS - ABANCAY”**

TESIS

PRESENTADO POR:

BACH. CARLA TAIPE CARRASCO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

ABANCAY - PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



Tesis

“CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE ENSALADAS ELABORADAS EN POLLERÍAS DEL
CENTRO POBLADO LAS AMÉRICAS -ABANCAY”

Presentado por **BACH. CARLA TAIPE CARRASCO**, para optar el Título de:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Sustentado y aprobado 21 de octubre del 2019 ante el jurado:

Presidente:


Dra. Dagnith Liz Bejarano Luján

Primer Miembro:


Ing. Lourdes Salcedo Sucasaca

Segundo Miembro:


Dr. Joffre Huamán Núñez

Asesor :


Mg. Blga. Gladys Marilú Castro Pérez

Agradecimientos

Agradezco a mis padres, por la confianza y el apoyo brindado, sin duda alguna en el trayecto de mi vida me han demostrado siempre su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos. A mis hermanos, por ser mi principal motivación, a mi tía Madeleyne por su apoyo incondicional, y en especial, gracias a Dante Dávalos, que durante estos años de carrera ha sabido apoyarme para continuar y nunca renunciar, gracias por su amor incondicional y por su gran ayuda en mi proyecto.

A mi Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, y a la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial, alma máter de mi formación profesional como Ingeniera Agroindustrial.

Finalmente, un eterno agradecimiento a mi asesora Blga. Gladys Marilú Castro Pérez, por su guía, por haber confiado en mi persona, por su paciencia y constante apoyo en la revisión, ejecución y realización del trabajo de investigación, a través de comentarios, discusiones y correcciones del trabajo.

Dedicatoria

A mis padres, Toribio y Sonia, pilares fundamentales en mi vida, su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir y destacar.

A mis hermanos, Kay, Gary y Liss, con mucho amor y cariño, a quienes amo infinitamente, son mi razón de seguir.

A Dante, compañero inseparable, quien representó un gran esfuerzo y apoyo en momentos de decline y cansancio.

A mi tía Madeleyne, por quien tengo un gran aprecio, por siempre estar dispuesta a escucharme y ayudarme en cualquier momento.

A ellos les dedico todo mi esfuerzo y trabajo realizado en esta tesis que, sin ellos, no hubiese podido ser.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I.....	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
1.1. Descripción del problema	4
1.2. Enunciado del problema	5
1.2.1. Problema general.....	5
1.2.2. Problema específico	5
1.3. Objetivos	5
1.3.1. Objetivo General	5
1.3.2. Objetivos Específicos	5
1.4. Justificación	5
1.5. Delimitación	6
CAPITULO II.....	7
MARCO TEORICO.....	7
2.1. Antecedentes.....	7
2.2. Marco referencial	9
2.2.1. Hortaliza	9
2.2.1.1. Procesamiento de hortalizas: Ensalada	9
2.2.1.2. Microbiología de hortalizas	10
2.2.2. Conformación de los criterios microbiológicos	12
2.2.3. Aptitud microbiológica para el consumo humano	12
2.2.4. Planes de muestreo.....	12
2.2.5. Criterios microbiológicos	14
2.2.6. Grupos de microorganismos	15
2.2.6.1. Microorganismos indicadores de alteración	15
2.2.6.1.1. Aerobios mesófilos	15
2.2.6.2. Microorganismos indicadores de higiene.....	17

2.2.6.2.1. Coliformes totales	17
2.2.6.2.2. <i>Escherichia coli</i>	18
2.2.6.3. Microorganismos patógenos	20
2.2.6.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.2.6.3.2. <i>Salmonella</i> y enfermedades asociadas	23
2.2.7. Adhesión microbiana	27
2.2.8. Tipos de muestras	29
2.2.9. Técnicas de muestreo	30
2.2.10. Enfermedades asociadas al consumo de verduras y hortalizas	30
2.2.11. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)	31
2.2.12. Contaminación cruzada de alimentos	33
2.2.13. Buenas prácticas de higiene para ensaladas	33
2.3. Marco conceptual	35
CAPITULO III	37
DISEÑO METODOLÓGICO	37
3.1. Definición de variables	37
3.2. Operacionalización de variables	37
3.2.1. Indicador	37
3.2.2. Índice /escala	37
3.3. Hipótesis de la investigación	38
3.3.1. Hipótesis General	38
3.3.2. Hipótesis Específicos	38
3.4. Tipo y diseño de la investigación	38
3.4.1. Análisis de datos	38
3.5. Población y muestra	39
3.5.1. Población	39
3.5.2. Muestra	39
3.6. Procedimiento de la investigación	40
3.6.1. Procedimiento de la toma de muestra	41
3.6.2. Procedimiento del análisis microbiológico de las muestras	42

3.6.2.1. Numeración de microorganismos aerobios mesófilos por el método de recuento estándar en placa.	42
3.6.2.2. Numeración de coliformes y <i>Escherichia coli</i> por el método del número más probable 42	
3.6.2.3. Numeración de <i>Staphylococcus aureus</i> (coagulasa positivo)	44
3.6.2.4. Investigación de <i>Salmonella sp.</i> por el método de ensayo de presencia/ausencia	44
3.7. Material de la investigación.....	45
3.7.1. Material de vidrio.....	45
3.7.2. Insumos	45
3.7.3. Reactivos	46
3.7.4. Equipos.....	46
3.7.5. Otros.....	46
CAPITULO IV	47
RESULTADOS	47
4.1. Descripción de los resultados	47
4.1.1. Recuento de aerobios mesófilos	48
4.1.2. Recuento de coliformes	49
4.1.3. Recuento de <i>Escherichia coli</i>	51
4.1.4. Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	53
4.1.5. Investigación de <i>Salmonella sp.</i>	54
4.2. Discusión de resultados	55
CAPITULO V	59
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
5.1. Conclusiones.....	59
5.2. Recomendaciones	60
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	61
ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Planes de muestreo para combinaciones de diferentes grados de riesgo para la salud y diversas condiciones de manipulación (*).....	13
Tabla 2. Criterio microbiológico para: Alimentos preparados sin tratamiento térmico (ensaladas crudas, mayonesas, salsa de papa huancaína, ocopas, postres, jugos, yogur de fabricación casera, otros). Alimentos preparados que llevan ingredientes con y sin tratamiento térmico (ensaladas mixtas, palta rellena, sándwich, cebiche, postres, refrescos, otros).....	14
Tabla 3. Descripción de las variables, indicadores e índices para la evaluación de ensaladas	37
Tabla 4. Pollerías del centro poblado Las Américas	41
Tabla 5. Resultado microbiológico promedio del análisis microbiológico de ensaladas de pollerías.	47
Tabla 6. Resultados promedio del recuento en placa para aerobios mesófilos en muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en UFC/g	48
Tabla 7. Resultados de coliformes de las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en NMP/g.	50
Tabla 8. Resultado de <i>E. coli</i> de las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en NMP/g.	51
Tabla 9. Resultados del recuento de <i>S. aureus</i> de las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en UFC/g.....	53
Tabla 10. Resultado de detección de <i>Salmonella sp.</i> en las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas	54

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Resultados microbiológicos por tipo de indicador microbiológico evaluado, expresado en porcentaje.	47
<i>Figura 2.</i> Diagrama de barras de los resultados de aerobios mesófilos en las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en UFC/g.	49
<i>Figura 3.</i> Detección de aerobios mesófilos, expresados en porcentaje.	49
<i>Figura 4.</i> Diagrama de barras de los resultados de coliformes de las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en NMP/g.	50
<i>Figura 5.</i> Detección de coliformes, expresados en porcentaje.	51
<i>Figura 6.</i> Gráfico de barras de los resultados de <i>E. coli</i> de las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en NMP/g.	52
<i>Figura 7.</i> Detección de <i>E. coli</i> , expresados en porcentaje.	52
<i>Figura 8.</i> Gráfico de barras de los resultados del recuento de <i>S. aureus</i> en las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en UFC/g.	53
<i>Figura 9.</i> Detección de <i>S. aureus</i> , expresados en porcentaje.	54
<i>Figura 10.</i> Detección de <i>Salmonella sp.</i> , expresados en porcentaje.	55

“CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE ENSALADAS ELABORADAS EN POLLERÍAS
DEL CENTRO POBLADO LAS AMÉRICAS -ABANCAY”

Esta publicación está bajo una Licencia Creative Commons



INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista sanitario la venta de alimentos es controversial, pues las deficientes prácticas de higiene en la preparación de estos, tienden a presentar riesgos considerables para la salud. En la actualidad, los establecimientos de comida de mayor concurrencia son las pollerías, siendo por ello indispensable llevar a cabo un control eficaz en la higiene de su preparación, sobre todo en las ensaladas que se sirven como complementos del plato principal, ya que su alteración, adulteración o contaminación, tanto química como biológica puede afectar seriamente a la salud del consumidor.

En la región de Apurímac, las ensaladas elaboradas a partir de vegetales en su mayoría de tallos cortos, son cultivados sin la aplicación de las buenas prácticas agrícolas, principalmente respecto a los estándares de calidad del agua de riego y suelos contaminados, pese a que existen normativas que aún no están implementadas en su totalidad; por otro lado, la falta de higiene del manipulador de alimentos, preparación anticipada a su consumo, cocción inadecuada, manipulador portador de gérmenes patógenos y las malas prácticas de higiene en la elaboración de estos alimentos, que se consumen crudos o cocidos, contribuyen a que sean medios de cultivos ideales para el desarrollo de microorganismos causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), representando un grave problema de salud pública. Cabe resaltar que, cumpliendo las buenas prácticas de higiene y manipulación de alimentos, todos estos factores serían fácilmente controlables.

La presente tesis tuvo como objetivo evaluar la calidad microbiológica de ensaladas preparadas en las pollerías del centro poblado Las Américas, realizando una evaluación del nivel de microorganismos indicadores de alteración, nivel de microorganismos indicadores de higiene y nivel de microorganismos patógenos, contribuyendo de esta manera a cuidar la salud de los consumidores reduciendo los casos de infecciones e intoxicaciones alimentarias.

RESUMEN

Las pollerías son uno de los establecimientos de mayor preferencia por los comensales, sin embargo, se desconoce la calidad microbiológica del mismo por lo que representa un riesgo para la salud. La investigación se realizó en el centro poblado Las Américas, con el objetivo de evaluar la calidad microbiológica de las ensaladas elaboradas en pollerías, mediante lo establecido en la Norma Sanitaria que constituye los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano (NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01.). Estos análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Biología y Microbiología de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, para ello, se realizó un muestreo censal, siendo en total 16 muestras de ensaladas mixtas de 200g cada una. Posteriormente, se realizó la enumeración de microorganismos indicadores de alteración: bacterias aerobias mesófilas, enumeración de microorganismos indicadores de higiene: coliformes y *Escherichia coli*, enumeración de microorganismos patógenos: *Staphylococcus aureus* e investigación de *Salmonella sp.*, según los procedimientos establecidos por la normativa vigente. Los resultados obtenidos analizados por estadística descriptiva indicaron que, para la enumeración de bacterias aerobias mesófilas, ninguna muestra sobrepasó los límites permisibles. Respecto a coliformes, 81% de las muestras presentaron niveles inaceptables, así como el 68,8% para *Escherichia coli*. En el análisis de *Staphylococcus aureus*, el 75% de las muestras sobrepasaron los límites permisibles y, por último, no se detectó presencia de *Salmonella sp.* Estos resultados fueron comparados con la Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano. Se concluyó que en promedio el 54,9% de las pollerías cumplen con los criterios microbiológicos establecidos, las muestras 7 y 8 presentaron condiciones microbiológicas permisibles, a diferencia de la muestra 1, que posee el recuento más alto.

Palabras clave: Ensaladas, criterios microbiológicos, norma sanitaria, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*

ABSTRACT

The pollerías are one of the establishments of greater preference for the diners, however, the microbiological quality of the same is unknown, so it represents a health risk. The research was carried out in the populated center Las Américas, with the objective of evaluating the microbiological quality of salads made in pollerías, by means of what is established in the Sanitary Standard that constitutes the Microbiological Criteria of Sanitary Quality and Safety for Food and Beverages for Consumption Human (NTS N ° 071-MINSA / DIGESA-V.01.). These microbiological analyzes were carried out in the Biology and Microbiology Laboratory of the Professional Academic School of Agroindustrial Engineering of the National University Micaela Bastidas de Apurímac, for this, a census sampling was carried out, being in total 16 samples of mixed salads of 200g each . Subsequently, the enumeration of alteration indicator microorganisms was performed: aerobic mesophilic bacteria, enumeration of hygiene indicator microorganisms: coliforms and *Escherichia coli*, enumeration of pathogenic microorganisms: *Staphylococcus aureus* and investigation of *Salmonella sp.*, according to the procedures established by current regulations. The results obtained analyzed by descriptive statistics indicated that, for the enumeration of aerobic mesophilic bacteria, no sample exceeded the permissible limits. Regarding coliforms, 81% of the samples presented unacceptable levels, as well as 68.8% for *Escherichia coli*. In the *Staphylococcus aureus* analysis, 75% of the samples exceeded the permissible limits and, finally, no presence of *Salmonella sp.* These results were compared with the Health Standard that establishes the Microbiological Criteria for Health Quality and Safety for Food and Beverages for Human Consumption. It was concluded that on average 54.9% of the pollerías meet the established microbiological criteria, samples 7 and 8 presented permissible microbiological conditions, unlike sample 1, which has the highest count.

Keywords: Salads, microbiological criteria, sanitary norm, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción del problema

La inocuidad de los alimentos, es un aspecto importante para la salud de las personas, ya que asegura que al ser ingeridos no provoquen ningún daño al consumidor. Las ensaladas preparadas en establecimientos como pollerías, al consumirse cocidas o directamente crudas pueden resultar ser perjudiciales para la salud, debido a diversos factores involucrados durante su preparación y expendio, ya que al estar expuesta directamente a factores contaminantes como la falta de higiene personal del manipulador de alimentos o factores externos como polvo, agua, entre otros, favorecen al desarrollo de ciertos microorganismos tales como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, entre otros, pudiendo originar cuadros gastroentéricos y otras afecciones para la salud. La contaminación se debe a diversas causas, como la infraestructura del establecimiento comercial, que en su mayoría son acondicionadas para tal fin, las deficientes prácticas de higiene durante su procesamiento (1), la contaminación cruzada en cualquier etapa de su preparación (2), el agua que no cumple con los estándares de calidad (3), las condiciones de almacenamiento, el tiempo de exposición del producto, la manipulación inapropiada por parte del personal, que además no cuenta con capacitación sobre manipulación de alimentos y en su mayoría no poseen carné de sanidad (4), estos factores aglomerados generan un problema crítico con gran impacto para la salud pública.

El consumo de alimentos contaminados trae consigo una serie de problemas en la salud, como son las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), que se manifiestan con intoxicaciones e infecciones alimentarias, siendo perjudiciales para los grupos vulnerables (niños, ancianos y mujeres embarazadas). El control sanitario en la preparación de alimentos es determinante para reducir los factores de riesgo que influyen en estas enfermedades. Es esencial, además, poseer información veraz y reproducible que permita desarrollar programas destinados a eliminar los peligros microbianos asociados al consumo de vegetales, así mismo crear directrices que permitan asegurar la calidad microbiológica de ensaladas y proteger la salud del consumidor. Sin embargo, en la región Apurímac, la información sobre la incidencia de estas enfermedades asociadas al consumo de ensaladas es limitada a pesar que son indispensables, ya que con base en ello es posible desarrollar medidas objetivas tendientes a disminuir o controlar este problema. Por tal motivo, en este trabajo se evaluó la calidad microbiológica de ensaladas elaboradas en pollerías, analizando si cumple o no con los criterios microbiológicos establecidos por la normativa sanitaria vigente en nuestro país.

1.2. Enunciado del problema

1.2.1. Problema general

¿Cuál es la calidad microbiológica de las ensaladas elaboradas en las pollerías del centro poblado Las Américas?

1.2.2. Problema específico

- ¿Los microorganismos indicadores de alteración: aerobios mesófilos se encuentran dentro de los parámetros establecidos en las muestras de ensaladas?
- ¿Los microorganismos indicadores de higiene: coliformes y *Escherichia coli* se encuentran dentro de los parámetros establecidos en las muestras de ensaladas?
- ¿Los microorganismos patógenos: *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.* se encuentran dentro de los parámetros establecidos en las muestras de ensaladas?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Evaluar la calidad microbiológica de las ensaladas elaboradas en las pollerías del centro poblado Las Américas.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el nivel de microorganismos indicadores de alteración: aerobios mesófilos en las muestras de ensaladas.
- Determinar el nivel de microorganismos indicadores de higiene: coliformes y *Escherichia coli* en las muestras de ensaladas.
- Determinar el nivel de microorganismos patógenos: *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.* en las muestras de ensaladas.

1.4. Justificación

En el Perú, durante el 2016 se informó y estudió un total de 56 brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), principalmente entre los meses de septiembre (14,3%) y abril (12,5%). Lima, Callao y Cusco han reportado el mayor número. La mayor frecuencia de los brotes reportados se produjo en eventos sociales y restaurantes, el 61% se dió en el ámbito urbano y el 39% en el rural. Se identificó como agente causal a *Salmonella* en 4 brotes, *E. coli* en 2 y Entamoeba un brote. (5)

Para el año 2017, se reportó en todos los departamentos episodios de Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA), siendo el departamento de Lima quien reportó mayor número de episodios, seguido de Arequipa. Comparativamente al mismo periodo de tiempo del 2016, se observó que, los episodios de EDA disminuyeron en un 0,8%, mientras que en algunos departamentos aumentaron,

siendo Lambayeque el que presentó mayor incremento, en un 19,5%. Asimismo, el departamento de Moquegua presentó la tasa de incidencia más elevada, seguido de Tacna, Arequipa, Ucayali y Pasco. Para el caso de Apurímac, durante el 2016 presentó una tasa de 14,4% de EDA, y en el 2017 tuvo un descenso a 12,4%. (6) Sin embargo, estos datos pueden ser mayores, ya que en ocasiones no se reportan todos los casos de infecciones e intoxicaciones alimentarias, sobre todo en las zonas rurales, donde este tipo de enfermedades se suele tratar de manera autónoma, sin la intervención de un especialista. A nivel local, los datos que brinda la Dirección de Salud Ambiental son escasos, en el mes de marzo del 2014, hubo una tasa de incidencia de 33,3% a comensales asistentes a pollerías, en octubre del 2017, una tasa de incidencia de 32,5% a personas que asistieron al aniversario de una institución educativa y, por último, en enero del 2019, se presentó una tasa de incidencia de 52,5% a asistentes también de pollerías. (7)

Según informes de prácticas pre profesionales realizados por los estudiantes de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac sobre inspecciones higiénico- sanitario a establecimientos de restaurantes y pollerías en la ciudad de Abancay, realizados en los años 2015-2017 se reportó que, en promedio solo el 4,0% de los establecimientos inspeccionados en toda la ciudad se encuentra en la categoría de aceptable, se realizó también una inspección por sectores con mayor cantidad de establecimientos, centro poblado Las Américas y Condebamba, siendo este primero en calificarse como no aceptable, a comparación de Condebamba que califica como restaurante en proceso. Con base en estos datos, se eligió el sector Las Américas para realizar los análisis microbiológicos correspondientes, evaluando de esta manera, el riesgo que puede representar para el consumidor.

Considerando que los brotes ocurridos, tienen relación con la falta de capacitación de los manipuladores, sistemas inadecuados de agua potable, desagüe y los problemas de higiene, se realizó la presente investigación con el objetivo de evaluar la calidad microbiológica de ensaladas preparadas en pollerías, lo que ayudará a proponer acciones correctivas y conseguir un mayor nivel de salud pública.

1.5. Delimitación

- Área** : Microbiología
- Sub-Área** : Microbiología de los alimentos
- Espacio** : El espacio geográfico de la toma de muestras fue las pollerías del centro poblado Las Américas (anexo 9), los análisis microbiológicos se realizaron en el laboratorio de Microbiología de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.
- Tiempo** : A partir del día de aprobación del proyecto, 14 de septiembre del 2018 hasta el mes de diciembre del mismo año

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

En un estudio realizado sobre “*Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, Staphylococcus sp. y hongos en ensaladas para perro calientes expandidas en la ciudad de Maracay, Venezuela*”, se determinó la presencia de coliformes totales, coliformes fecales, otras Enterobacterias y *Staphylococcus sp.* y hongos en las muestras de ensaladas crudas para perros calientes expandidas en el centro de la ciudad de Maracay, Venezuela. Se empleó la técnica del número más probable para cuantificar los coliformes y *Staphylococcus sp.* El resultado para coliformes totales fue $1,44 \times 10^5$ NMP/g; coliformes fecales $4,57 \times 10^4$ NMP/g; no se detectó *E. coli* en las muestras analizadas, sin embargo, de 87 cepas aisladas se determinó la presencia de *Citrobacter freundii* Variedad I (45,09% de las cepas aisladas), *Citrobacter freundii* Variedad II (21,57%), *Enterobacter aerogenes* Variedad I (17,65%) y *Enterobacter aerogenes* Variedad II (15,69%); *Staphylococcus sp.* $3,93 \times 10^6$ NMP/g. Las 52 cepas de presuntos *Staphylococcus sp.* resultaron coagulasa negativa. (8)

Se realizó una investigación sobre la “*Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica*”, para ello se ejecutó un análisis completo de diez años de evaluación de la calidad bacteriológica de alimentos consumidos por costarricenses, realizado en la Sección de Microbiología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica. Se prestó especial interés a los alimentos de venta ambulante, a los expandidos en festejos populares y a los obtenidos a partir de algunos servicios de alimentación pública. Se incluyó el análisis de la presencia de algunas bacterias patógenas en ellos. Los resultados obtenidos demuestran una importante contaminación fecal y la presencia de algunos patógenos en estos alimentos. Se concluyó que se deben introducir mejoras en el procesamiento, transporte y almacenamiento de los alimentos, y realizar un control sanitario estricto y constante, de manera que no representen un riesgo para la salud pública. (9)

Se realizó un estudio sobre la “*Calidad bacteriológica de ensaladas de zanahoria rallada y eficacia de tratamientos previos a su consumo*”, cuyo objetivo fue evaluar la calidad microbiológica de ensaladas de zanahoria rallada mediante la eficacia de los tres tratamientos más utilizados por los consumidores: lavado con agua potable, desinfección con hipoclorito de sodio y con solución de vinagre, en 30 muestras. Obteniendo como resultado que el 50% de las muestras no cumplió con el criterio microbiológico para *Escherichia coli*, el 7% presentó *Salmonella sp.* que se eliminó con la aplicación de hipoclorito y el 100% de las muestras presentaron recuentos de *Staphylococcus aureus* pero que no constituyen un riesgo potencial. (10)

Se realizó un estudio sobre la “*Contaminación fecal de ensaladas expandidas en las principales pollerías de Huánuco*” para determinar el nivel de contaminación fecal (*Escherichia coli*), mediante

un método de estudio observacional, analítico y comparativo. En los resultados la contaminación fecal de las ensaladas por *Escherichia coli* fue del 45,0%, concluyendo que este resultado se debe a factores de uso de agua insegura; exhibición desordenada y sin separar en recipientes de fácil limpieza; falta de despacho en bolsas plásticas transparentes o blancas; episodio de enfermedad y heridas con infecciones en piel y mucosas; manos sucias y con joyas, uñas largas, sucias y con esmalte; utensilios en mal estado y sucios. (11)

Se llevó a cabo una investigación sobre la “Evaluación microbiológica y sanitaria de puestos de venta ambulatoria de alimentos del distrito de Comas, Lima - Perú”; cuyo objetivo fue evaluar la calidad microbiológica y sanitaria de puestos de venta ambulatoria, para ello se analizó el número de coliformes fecales y la presencia de *Salmonella sp.* en muestras de alimentos, agua, superficies inertes y superficies vivas; obteniendo como resultado 60,7% de coliformes fecales en una o más muestras analizadas. Por tipo de muestra de alimentos, 41,0% tuvieron un resultado no apto para el consumo humano, y respecto a las muestras de agua, superficies inertes y superficies vivas, se encontraron resultados microbiológicos inaceptables (coliformes fecales >100 NMP/g). No se encontró *Salmonella sp.* en ninguna de las muestras evaluadas. Sobre la evaluación sanitaria, 90,2% de las muestras tuvieron “Riesgo Sanitario Alto”, observándose deficiencias estructurales y culturales de manipulación e higiene de alimentos. Finalmente, encontraron relación entre los resultados microbiológicos y las características de evaluación sanitaria. (12)

En el estudio sobre “Contaminación fecal en hortalizas que se expendan en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú”, se determinó el nivel de coliformes fecales y la frecuencia de *Escherichia coli* en muestras de hortalizas, obtenidas de manera aleatoria y expendidas en los principales mercados de Cajamarca. El 40% de muestras presentaron coliformes fecales, con elevado número más probable por gramo (NMP/g) e importante frecuencia de *E. coli* en perejil y lechuga. El análisis reveló un alto nivel de contaminación fecal, un estado sanitario inaceptable y la necesidad de establecer medidas de control frente al riesgo que esto representa para la salud. (13)

En el informe de prácticas pre profesionales sobre “Inspección a restaurantes y pollerías en el distrito de Abancay”, en el cual se tuvo como objetivo evaluar las condiciones generales de establecimientos comerciales, se reportó que, del 100% de restaurantes inspeccionados, el 30% correspondió a los restaurantes del sector de Condebamba que obtuvieron el calificativo de restaurante en proceso, el 2% lo representó el restaurante “El Pisonay”, que es respaldado por el programa “restaurantes saludables”, obtuvo el calificativo de Aceptable, mientras que el 68% de restaurantes lo representó el sector de Las Américas, quienes obtuvieron el calificativo de No Aceptable. Los factores de contaminación más frecuentes fueron el diseño del establecimiento, falta de higiene e indumentaria del manipulador de alimentos, falta de aplicación de BPM y presencia de vectores. (14)

2.2. Marco referencial

2.2.1. Hortaliza

Se considera hortaliza, de forma genérica, a cualquier planta herbácea hortícola en sazón para que se pueda utilizar como alimento, ya sea en crudo o cocinado. Las verduras son un grupo de hortalizas en las que la parte comestible está constituida por sus órganos verdes (hojas, tallos o inflorescencias). Según la parte de la planta que se utiliza como alimento, se diferencian en:

- Raíces y tubérculos (zanahoria, rábano, betarragas, etc.).
- Bulbos (cebollas, poro, etc.).
- Hojas y tallos tiernos (lechuga, acelga, espinaca, etc.).
- Coles (repollo, coliflor, brócoli, etc.).
- Frutos de hortalizas (pepino, tomate, arvejas, maíz, etc.). (15)

2.2.1.1. Procesamiento de hortalizas: Ensalada

Una ensalada es, en líneas generales, un plato frío con hortalizas mezcladas, cortadas en trozos y aderezadas, fundamentalmente con sal, aceite vegetal y vinagre. Puede tomarse como plato único, antes o después del plato principal e incluso como complemento. (15)

La importancia de las verduras en la alimentación humana no reside en su contenido de proteínas, grasa e hidrato de carbono que, salvo a excepciones es bajo, sino en las sales minerales y vitaminas, así como en la celulosa. Entre las sales minerales, abunda el hierro, el cobre en todas las hojas verdes; pero sobre todo el calcio, elemento en el que la mayoría de alimentos, excepto la leche, son pobres. Una buena proporción de calcio la contienen el apio, vainitas y todas las hojas verdes de las hortalizas que se consumen crudas. Entre las funciones que las verduras ejercen sobre el metabolismo intestinal, está la de intervenir en el desarrollo de la flora bacteriana intestinal, responsable de las fermentaciones útiles, haciéndola predominar sobre la flora de la putrefacción, procedente, casi siempre, de alimentos de origen animal. (15)

La composición química responde a:

- Agua (62-96 por 100).
- Proteínas (0,90-23 por 100).
- Grasas (0,1-1,7 por 100).
- Glúcidos (3-27 por 100).
- Sales minerales (0,5-2,8 por 100).
- Vitaminas (A, B₁, B₂, C, E y K). (15)

2.2.1.2. Microbiología de hortalizas

La flora microbiana de las hortalizas reside en su superficie, como consecuencia de su contacto con el suelo, aire, agua y animales. El pH de estos alimentos suele ser neutro, por lo que entre su microflora son más frecuentes las bacterias que las levaduras. En las raíces y tubérculos se encuentran formas esporuladas de los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. Cuando se riega con aguas fecales, es común la presencia de *Salmonella*, *E. coli* y otras *Enterobacteriaceae*. El riego con aguas fecales puede ser, igualmente, la causa de transmisión con huevos y quistes de parásitos gastrointestinales que suponen un peligro para el caso de verduras que se consumen crudas. (15)

Las hortalizas crudas sólo participan de un modo secundario en las infecciones transmitidas por alimentos. Cuando aparecen estas infecciones, son debidas a la contaminación por estiércol o aguas residuales, por ejemplo, huevos de vermes, quistes de protozoos, bacterias y virus entéricos como el de la hepatitis A. Las bacterias patógenas y amebas pueden sobrevivir por un tiempo en el suelo y contaminar las hortalizas que serán consumidas crudas. El lavado y desinfección de estos alimentos puede reducir algo del problema, pero no eliminarlo. Con el fin de controlar estos peligros son necesarias las siguientes precauciones:

- Evitar el uso de aguas fecales y de estiércol animal no compostado como abono.
- Evitar el riego con agua contaminada.
- Lavar previamente todas las materias primas con agua potable.
- Higienizar con un agente desinfectante. (16)

Las distintas etapas que un producto debe pasar desde la cosecha hasta el consumo tanto fresco como procesado, proveen innumerables oportunidades para incrementar el nivel de contaminación que naturalmente trae del campo. La presencia de materiales extraños dentro del envase o sobre el producto, tales como suciedades (tierras, deposiciones animales, grasas, cabellos humanos, etc.), insectos vivos o muertos, restos vegetales, de materiales de empaque, etc., es profundamente rechazada por los consumidores. Sin embargo, como normalmente se debe a descuidos o irresponsabilidades en la preparación o manipuleo, son fáciles de detectar y eliminar. Mucho más preocupante es la presencia de microorganismos perjudiciales para la salud, no visible a simple vista ni detectable a través de cambios en la apariencia, sabor, color u otra característica externa. Se ha demostrado que determinados patógenos tienen la capacidad de persistir sobre el producto lo suficiente como para constituir un peligro para el ser humano y de hecho se han reportado numerosos casos de enfermedades asociadas al consumo de hortalizas. (15)

Esencialmente existen tres tipos de organismos que pueden ser transportados por las verduras y que representan un peligro para la salud humana: virus (*Hepatitis A*, por ejemplo), bacterias (*Salmonella spp*, *Escherichia coli*, entre otras) y parásitos (*Giardia lamblia*). Los hongos normalmente no representan un peligro en sí mismos, sino a través de las micotoxinas que producen. Para que esto ocurra, sin embargo, tiene que haber transcurrido el tiempo necesario para que se desarrolle. (15)

La contaminación se da por los siguientes factores:

- **Por los animales:** Los microorganismos de origen animal proceden de su flora superficial, de la flora de sus vías respiratorias y de la flora de su tubo gastrointestinal. La flora microbiana propia de la superficie corporal de los animales productores de carne no suele tener tanta importancia como los microorganismos contaminantes del tubo intestinal y de las vías respiratorias. Sin embargo, la piel, las pezuñas y el pelo, no sólo contienen una gran cantidad de microorganismos procedentes del suelo, del estiércol, de los piensos y del agua, sino también especies importantes de microorganismos que alteran los alimentos. Las plumas y las patas de las aves de corral contienen una importante contaminación de procedencia parecida. La piel de muchos animales productores de carne puede contener micrococos, estafilococos y estreptococos beta-hemolíticos. Las heces y los alimentos de origen animal contaminados por las mismas pueden contener diversos microorganismos entéricos, incluso del género *Salmonella*. Las salmonelosis de los animales pueden ser la causa de que se contaminen los productos y subproductos animales y, de este modo contaminar con *Salmonella* los alimentos derivados de los mismos. (17)
- **Por las aguas residuales:** Cuando en el abonado de los cultivos se utilizan aguas residuales domésticas sin tratar, existe la posibilidad de que los alimentos vegetales recién cosechados estén contaminados por microorganismos patógenos para el hombre, sobre todo por aquellos que producen trastornos gastrointestinales. Además de la posibilidad de que los alimentos estén contaminados por patógenos procedentes de las aguas residuales, también los pueden contaminar otros microorganismos de esta misma procedencia, como por ejemplo bacterias coliformes, bacterias anaerobias, enterococos, otras bacterias intestinales y virus. (17)
- **Por el suelo:** El suelo contiene la mayor variedad de microorganismos procedentes de todas las fuentes de contaminación. En los suelos fértiles, no sólo existen gran número de especies de microorganismos, sino que también existe un elevado número total de los mismos, dispuestos a contaminar la superficie de las plantas que crecen sobre él o en su interior y la superficie de los animales que se desplazan sobre la tierra firme. El polvo del suelo es levantado por las corrientes de aire, y las partículas de tierra son arrastradas por las corrientes

de agua para alcanzar el interior o la superficie de los alimentos. El suelo es una importante fuente de bacterias esporógenas termorresistentes. (17)

- **Por el agua:** Las aguas naturales no sólo contienen su propia flora microbiana, sino que también contienen microorganismos procedentes del suelo y posiblemente microorganismos procedentes de los animales y de las aguas residuales. El número de bacterias de estas aguas puede oscilar desde unas pocas hasta varios cientos por mililitro. Las especies bacterianas existentes en las aguas naturales son principalmente especies de los géneros *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Proteus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* (enterococos), *Enterobacter* y *Escherichia*. Es probable que las bacterias pertenecientes a los tres últimos géneros, más que parte integrante de su flora propia, sean contaminantes (17). Las verduras al ser consumidas sin ningún tipo de cocción, son potencialmente peligrosas en caso de que exista contaminación. Es muy difícil tener una idea de la magnitud de este tipo de problemas, pues normalmente no son reportados a menos que sean graves. Además, cuando ocurren problemas de salud debido a la ingestión de alimentos, la imagen de alimento sano de las verduras las excluye de toda sospecha y normalmente la culpa recae en algún otro alimento ingerido ese mismo día. (15)

2.2.2. Conformación de los criterios microbiológicos

Los criterios microbiológicos están conformados por:

- a) El grupo de alimento al que se aplica el criterio.
- b) Los agentes microbiológicos a controlar en los distintos grupos de alimentos.
- c) El plan de muestreo que ha de aplicarse al lote o lotes de alimentos.
- d) Los límites microbiológicos establecidos para los grupos de alimentos. (18)

2.2.3. Aptitud microbiológica para el consumo humano

Los alimentos y bebidas serán considerados microbiológicamente aptos para el consumo humano cuando cumplan en toda su extensión con los criterios microbiológicos establecidos por la norma sanitaria (RM N° 591-2008/MINSA) para el grupo y subgrupo de alimentos al que pertenece. (18)

2.2.4. Planes de muestreo

Los planes de muestro solo se aplican a lotes o lote de alimentos y bebidas, se sustentan en el riesgo para la salud y las condiciones normales de manipulación y consumo del alimento. Los planes de muestreo se expresan en planes de 2 o 3 clases que dependen del grado de peligro involucrado. (18)

Un plan de muestreo de 2 clases se usa cuando no se puede tolerar la presencia o ciertos niveles de microorganismo en ninguna de las unidades de muestra. Un plan de muestreo de

3 clases se usa cuando se puede tolerar cierta cantidad de microorganismos en algunas de las unidades de muestra. Al diseñar un plan de muestreo para un alimento en particular deben establecerse los valores de n, m, M y c. El programa de muestreo se aplica a: Registro Sanitario y Certificación Sanitaria Oficial de Exportación y se basa en el tipo y riesgo que conllevan las especies microbianas analizadas y las condiciones previsibles de manejo y consumo a las que se someterá el alimento luego de su fabricación o elaboración.

El plan de dos clases provenientes de un muestreo por atributos; en este caso la aceptación o el rechazo estará definido por n y c.; el plan de tres clases proveniente de un muestreo por atributos; en este caso la aceptación o el rechazo estará definido por n, m, M y c, donde c tendrá como límites m y M. Se rechazarán todos aquellos resultados cuyos valores sean superiores a M; ninguna de las muestras del plan de tres clases sobrepasará el valor de M.

(18)

Tabla 1. Planes de muestreo para combinaciones de diferentes grados de riesgo para la salud y diversas condiciones de manipulación (*)

SEVERIDAD, TIPO DE RIESGO PARA LA SALUD	Condiciones normales de manipulación y de riesgo para consumo del alimento luego del muestreo		
	Condiciones que reducen el riesgo	Condiciones que no modifican el riesgo	Condiciones que pueden aumentar el riesgo
Sin riesgo directo para la salud (contaminación general, vida útil y alteración)	Categoría 1 3 clases n=5, c=3	Categoría 2 3 clases n=5, c=2	Categoría 3 3 clases n=5, c=1
Riesgo para la salud bajo, indirecto (indicadores)	Categoría 4 3 clases n=5, c=3	Categoría 5 3 clases n=5, c=2	Categoría 6 3 clases n=5, c=1
Moderado, directo, diseminación limitada	Categoría 7 3 clases n=5, c=2	Categoría 8 3 clases n=5, c=1	Categoría 9 3 clases n=10, c=1
Moderado, directo, diseminación potencialmente extensa	Categoría 10 2 clases n=5, c=0	Categoría 11 2 clases n=10, c=0	Categoría 12 2 clases n=20, c=0
Grave directo	Categoría 13 2 clases n=15, c=0	Categoría 14 2 clases n=30, c=0	Categoría 15 2 clases n=60, c=0

(*) Fuente: Métodos de muestreo para el análisis microbiológico, principios; principios y aplicaciones específicas. International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMFS)

Excepciones en que “n” es diferente de 5

- Número de unidades de muestra para registro sanitario de alimentos y bebidas:** El número de unidades de muestra de alimentos y bebidas (n) para la inscripción en el registro sanitario podrá ser igual a uno (n=1) y deberá ser calificada con los límites más exigentes (m) indicadas en la presente disposición para este tipo de alimentos o bebidas.

- b) **Número de unidades de muestra para la verificación del plan HACCP:** Para la verificación del Plan HACCP, el número de unidades de muestra de los planes de muestreo podrá ser igual a uno (n=1) y deberá ser calificada con los límites más exigentes (m) indicadas en la presente disposición para este tipo de alimentos o bebidas. Esto procederá si una persona natural o jurídica que opera o intervenga en cualquier proceso de fabricación, elaboración e industrialización de alimentos y bebidas, demuestre mediante documentación histórica con un mínimo de 6 meses, que cuentan con procedimientos eficaces basados en los principios del sistema HACCP.
- c) **Número de unidades de muestra para la vigilancia sanitaria de alimentos preparados:** Para el caso de la vigilancia sanitaria de alimentos y bebidas preparados provenientes de establecimientos de comercialización, preparación y expendio, se podrá tomar una unidad (n=1) de muestra por cada tipo de alimento preparado que deberán ser calificadas con los límites más exigentes (m), indicados en la presente disposición. (18)

2.2.5. Criterios microbiológicos

Los alimentos y bebidas deben cumplir íntegramente con la totalidad de los criterios microbiológicos correspondientes a su grupo o subgrupo para ser considerados aptos para el consumo humano, RM No 591-2008/MINSA.

Tabla 2. *Criterio microbiológico para: Alimentos preparados sin tratamiento térmico (ensaladas crudas, mayonesas, salsa de papa huancaína, ocopa, aderezos, postres, jugos, yogur de fabricación casera, otros). Alimentos preparados que llevan ingredientes con y sin tratamiento térmico (ensaladas mixtas, palta rellena, sándwich, cebiche, postres, refrescos, otros).*

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g o ml	
					m	M
Aerobios mesófilos	2	3	5	2	10 ⁵	10 ⁶
Coliformes	5	3	5	2	10 ²	10 ³
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	3	5	2	10	10 ²
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	10	10 ²
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25g	---

Fuente: (18)

Donde:

- n:** número de unidades de muestra seleccionada al azar de un lote, que se analizan para satisfacer los requerimientos de un determinado plan de muestreo.
- c:** número máximo permitido de unidades de muestra rechazables en un plan de muestreo de 2 clases o número máximo de unidades de muestra que puede contener un número

de microorganismos comprendidos entre "n" y "M" en un plan de muestreo de 3 clases. Cuando se detecte un número de unidades de muestra mayor a "c" se rechaza el lote.

m: límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable. En general, un valor igual o menor a "m", representa un producto aceptable y los valores superiores a "m" indican lotes aceptables o inaceptables.

M: los valores de recuentos microbianos superiores a "M" son inaceptables, el alimento representa un riesgo para la salud.

2.2.6. Grupos de microorganismos

De acuerdo a la NTS (Norma Técnica Peruana) N°071-MINSA/DIGESA-V.01. NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD SANITARIA E INOCUIDAD PARA LOS ALIMENTOS Y BEBIDAS DE CONSUMO HUMANO (RM N°591-2008/MINSA), se establecen los siguientes criterios microbiológicos que deben cumplir los alimentos y bebidas en estado natural, elaborados o procesados, para ser considerados aptos para el consumo humano: a) El grupo de alimento al que se aplica el criterio; b) Los agentes microbiológicos a controlar en los distintos grupos de alimentos; c) El plan de muestreo que ha de aplicarse al lote o lotes de alimentos; y, d) Los límites microbiológicos establecidos para los grupos de alimentos. El cumplimiento de estos criterios en su totalidad determina si un alimento o bebida es apto para el consumo humano. (18) Como referencia para los criterios microbiológicos, en general los microorganismos se agrupan como: microorganismos indicadores de alteración, microorganismos indicadores de higiene y microorganismos patógenos.

2.2.6.1. Microorganismos indicadores de alteración

Las categorías 1, 2, 3 definen los microorganismos asociados con la vida útil y alteración del producto tales como microorganismos aerobios mesófilos, bacterias heterotróficas, aerobios mesófilos esporulados, mohos, levaduras, levaduras osmófilas, bacterias ácido lácticas, microorganismos lipolíticos. (18)

La presencia de determinados microorganismos en los alimentos puede ser de provecho para determinar la calidad microbiológica de los alimentos, ya que estos pueden y son utilizados como indicadores. Los grupos microbianos indicadores de alteración de mayor aplicación en los alimentos son los aerobios mesófilos. (17)

2.2.6.1.1. Aerobios mesófilos

Son un grupo heterogéneo de microorganismos, se incluye en él a todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 30 °C en las condiciones establecidas (medios de cultivo, tiempo y temperatura de incubación) y queda claro que se puede incluir

microorganismos patógenos (17). En este recuento se estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos. Esta determinación indica el grado de contaminación de una muestra y las condiciones que han favorecido o reducido la carga microbiana. Tasas superiores entre 10^5 y 10^7 gérmenes por gramo suelen ser ya inicios de descomposición. Es un indicador importante en alimentos frescos, refrigerados y congelados, en lácteos y en alimentos listos para consumir, existiendo criterios diferentes para cada alimento y límites de aceptabilidad, y así el recuento de estas bacterias en el agua, alimentos y otros materiales relacionados puede tener según el caso aplicaciones de interés que pondrían de manifiesto lo siguiente:

- a) *La exposición a fuentes de contaminación:* esto tiene mucho significado debido a que la presencia de estos microorganismos en los alimentos en cantidades mayores a lo establecido ($>10^5$ ufc/g); nos indica que posiblemente se haya violado una norma de trabajo, lo cual es considerado como inaceptable, así como nos indica que el tratamiento bajo el cual se preparó el alimento ha sido ineficiente.
- b) *Condiciones de almacenamiento:* la presencia de aerobios mesófilos en los alimentos nos muestra la temperatura bajo la cual este se ha encontrado. Una temperatura entre 20-40 °C favorecería el desarrollo de la microflora. De ahí que cifras elevadas, son sugestivas de productos conservados bajo condiciones de abuso de temperatura.
- c) *Un elevado número de aerobios mesófilos en un alimento admite tres interpretaciones:*
 - Intensa exposición a la contaminación.
 - Una discreta contaminación seguida de condiciones de conservación que favorezca la actividad microbiana.
 - Intensa contaminación y almacenamiento inadecuado.
- d) *La eficiencia de tratamientos antimicrobianos:* está claro que, al realizar un tratamiento a un alimento, el objetivo es el de eliminar la mayoría o en su totalidad la carga microbiana y por lo tanto midiendo esta carga microbiana podemos evaluar el tratamiento realizado y su eficiencia.
- e) *Predicción de vida de anaquel:* al realizar un recuento de aerobios mesófilos en un alimento, tiene significado para estimar el tiempo que, bajo condiciones definidas de almacenamiento, habrá de transcurrir antes que se presente signos de deterioro. (19)

El recuento en la flora aerobia mesófila tiene un valor limitado a la hora de juzgar la seguridad de los alimentos. Su presencia indica si la limpieza desinfección y el control de temperatura, durante los procesos de tratamiento industrial, transporte y almacenamiento se han realizado en forma adecuada. Esta determinación permite también información sobre la alteración incipiente de los alimentos, su probable vida útil, la descongelación incontrolada de los

alimentos congelados o los fallos de mantenimiento de las temperaturas de refrigeración en los alimentos refrigerados. (18)

- **Método de detección de aerobios mesófilos:** Para determinar el número de gérmenes por gramo o mililitro del alimento en estudio se utiliza la técnica del recuento en placa utilizando un medio de cultivo, el agar nutritivo de recuento agar Plate Count (APC). (20)

2.2.6.2. Microorganismos indicadores de higiene

En las categorías 4, 5 y 6 se encuentran los microorganismos no patógenos que suelen estar asociados a ellos, como coliformes (que para efectos de la presente norma sanitaria se refiere a coliformes totales), *Escherichia coli*, anaerobios sulfito reductores, *Enterobacteriaceas* (a excepción de preparaciones en polvo o fórmulas para lactantes, que se consideran en el grupo de microorganismos patógenos). (18)

2.2.6.2.1. Coliformes totales

Este grupo de bacterias pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, se caracterizan porque fermentan la lactosa con producción de gas a 35–37 °C en 48 horas, son bacilos Gram negativos, no formadores de esporas de vida libre y se transmiten por malos hábitos de manipulación en los alimentos. Este grupo incluye los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus* y *Klebsiella*. Son particularmente útiles como componentes de criterios microbiológicos para indicar contaminación posproceso térmico. La presencia de bacterias coliformes en los alimentos no significa necesariamente que hubo una contaminación fecal o que hay patógenos entéricos presentes, ya que, algunos coliformes (*E. coli*) son comunes en las heces del hombre y otros animales, pero otros (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*) comúnmente se encuentran en el suelo, agua y semillas. Estos organismos se eliminan fácilmente por tratamiento térmico, por lo cual su presencia en alimentos sometidos al calor sugiere una contaminación posterior al tratamiento térmico o que éste ha sido deficiente. Esto debería generar la determinación del punto del proceso donde se produjo la contaminación, lo que puede explicarse porque probablemente existieron fallas (ausencia o deficiencia) en la refrigeración poscoCCIÓN (20). Los coliformes son el grupo indicador con mayor tradición en la microbiología sanitaria siendo desde sus inicios asociados a la presencia con contaminación fecal en el agua. Y en aquellos alimentos que han recibido un tratamiento sugieren que estos han tenido contacto con materiales sucios y por tal razón su presencia en los alimentos nos ayuda a vigilar la calidad sanitaria del agua y los alimentos (19).

- **Desarrollo:** Se desarrollan fácilmente en medios de cultivo ordinarios, facultad que se presenta en muchos alimentos y que se suprime fuera de los siguientes límites: pH entre 4,0 y 8,5, temperatura entre 4 y 46 °C, o actividad de agua menor de 0,935. (19)
- **Sobrevivencia:** Cuando sufren congelación estos se reducen notablemente pero este número persisten por periodos largos. Son inactivados al ser sometidos a tratamientos térmicos moderados como lo es el caso de la pasteurización. Además, son inactivados en presencia de luz ultravioleta, de sustancia químicas como los yodóforos y compuestos clorados. (19)
- **Significado de los coliformes en los alimentos:** Su presencia en los alimentos indica el posible contacto con materia fecal, así como contacto con el medio ambiente y en caso de ser encontrados luego de un tratamiento de desinfección, indica que han tenido contacto con alguna clase de materia sucia o que simplemente el tratamiento realizado no fue efectivo. (19)

2.2.6.2.2. *Escherichia coli*

Bacterias bacilos cortos, Gram negativas. Pertenece a las *Enterobacteriaceae* lactosapósitivas, se encuentra en el tracto intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, produce gas a una temperatura de 44 a 44,5 °C ± 0,2. Los criterios microbiológicos que incluyen *E. coli* son de utilidad en casos en que se desea determinar contaminación fecal, ya que la contaminación de un alimento con esta bacteria implica el riesgo de que puedan encontrarse en el mismo, patógenos entéricos que constituyan un riesgo para la salud. Sin embargo, la ausencia de *E. coli* no asegura la ausencia de patógenos entéricos. (20)

Se considera indicador de contaminación fecal reciente, humana o animal en productos como agua embotellada, leche y jugos, alimentos infantiles, y alimentos procesados, en general, *E. coli* se puede eliminar fácilmente mediante procesos térmicos. Su presencia en el alimento que ha sido sometido a temperaturas elevadas significa un proceso deficiente o, lo que es más común, una contaminación posterior al proceso atribuible al equipo, manipuladores o contaminación cruzada. Sin embargo, si el objetivo del análisis es controlar la contaminación postratamiento térmico, los organismos seleccionados deberían ser las bacterias coliformes en lugar de *E. coli*. (20)

La presencia de este microorganismo en un alimento, indica generalmente una contaminación directa o indirecta de origen fecal. *E. coli* es el indicador clásico de la posible presencia de patógenos entéricos en el agua, en los moluscos, en los productos lácteos y en otros alimentos. La enumeración de *E. coli* en los alimentos puede estar influenciado por factores como: la multiplicación del microorganismo, su muerte o inactivación, o su adherencia a las partículas del alimento (18).

- **Características:** *E. coli* es una bacteria Gram negativa que pertenece a la familia *enterobacteriaceae*, es un bacilo no esporulado, puede poseer flagelos peritricos o ser inmóvil y es anaerobio facultativo. La temperatura mínima para su crecimiento es de 2,5 °C y la máxima de 45 °C; puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración y de congelación. El rango de pH en el cual se ha observado crecimiento es de 4,4 a 9,0 y la mínima actividad de agua para su desarrollo es de 0,95. *E. coli* es parte importante de la microbiota intestinal del hombre, coloniza el intestino dentro de las primeras horas de vida y a partir de entonces se convierte en un residente permanente, estableciendo una relación de mutuo beneficio con su hospedero, sin embargo, algunas cepas han desarrollado capacidad para provocar enfermedad en el hombre, principalmente infecciones gastrointestinales, urinario y del sistema nervioso central. (19)
- **Tipos:** Los serotipos de la especie que son patógenos para el hombre se les denominó genéricamente con el término de *Escherichia coli* patógena y su capacidad para producir enfermedad está determinada por factores de virulencia que le permiten infectar a sus huéspedes y sobreponerse a los mecanismos de defensa, como la producción de adhesinas, enterotoxinas, citotoxinas y otras proteínas que le permiten al microorganismo sobrevivir en condiciones ambientales adversas. Las cepas patógenas que causan diarrea se transmiten de manera directa a través de los alimentos y causan distintos síndromes clínicos; las heces de animales de sangre caliente, el agua no tratada y los portadores infectados suelen ser la fuente de contaminación más común a los alimentos (19). Existen varios grupos que pueden producir cuadros entéricos leves a severos, entre ellos tenemos:
 - *E. coli* enterotoxigénico (ETEC) – gastroenteritis diarrea del viajero.
 - *E. coli* enteropatógeno (EPEC) – diarrea infantil.
 - *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) – colitis hemorrágica.
 - *E. coli* enteroinvasivo (EIEC) – disentería bacilar

Se encuentran en el tracto intestinal de los mamíferos y el hombre. La fuente de contaminación son los alimentos de procedencia dudosa. La contaminación se realiza por vía digestiva. (18)

- **Dosis infectiva:** Para los tipos patógenos de *Escherichia coli* la dosis infectiva es de 10⁶ – 10¹⁰ log₁₀ de células viable/g. (21)
- **Recuento e identificación de coliformes y *E. coli***

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 ± 1 °C durante 48 horas, utilizando un medio de cultivo que contenga sales biliares. Esta determinación consta de dos

fases, la fase presuntiva y la fase confirmativa. En la 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 encuentren presentes en la muestra y que sean capaces de utilizar a la lactosa como fuente de carbono. Durante la fase confirmativa se emplea como medio de cultivo 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 $44,5 \pm 0,1$ °C por un periodo de 24 a 48 horas (22).

La búsqueda de *E. coli* se realiza a partir de los tubos positivos de caldo EC, los cuales se siembran por agotamiento en medios selectivos y diferenciales (Agar MacConkey, Agar eosina azul de metileno) y posteriormente realizando las pruebas bioquímicas básicas (IMViC) a las colonias típicas. (23).

2.2.6.3. Microorganismos patógenos

Son los que se hallan en las categorías 7 a la 15. Las categorías 7, 8 y 9 corresponde a microorganismos patógenos tales como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, cuya cantidad en los alimentos condiciona su peligrosidad para causar enfermedades alimentarias. A partir de la categoría 10 corresponde a microorganismos patógenos, tales como *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes* (*), (para el caso de alimentos que pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*), *Escherichia coli* O157:H7 y *Vibrio cholerae* entre otros patógenos, cuya sola presencia en los alimentos condiciona su peligrosidad para la salud.

(*) Para el caso de alimentos que no favorecen en la proliferación de *L. monocytogenes* se considera $m < 100$. (Referencia, Evaluación de Riesgos de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. FAO/OMS 2004, Comité del Codex sobre Higiene de los alimentos, adoptado por la Comunidad Europea Reglamento CE 2073/2005-D.O.U.E de 22/12/05-relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios). (18)

2.2.6.3.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, es un microorganismo Gram (+), anaerobio facultativo y se halla ampliamente distribuido en carnes, leches, quesos y ambientes naturales como suelo, polvo, aire, etc. Es altamente vulnerable a la destrucción por tratamiento térmico y a casi todos los agentes sanitizantes. Así la presencia de esta bacteria o sus enterotoxinas en alimentos procesados o en equipos de procesamiento de alimentos generalmente es un indicador de una

sanidad deficiente. *Staphylococcus* ha sido identificado como el agente causante de muchos brotes de intoxicación alimentaria y es el posible responsable incluso de más casos de individuos y grupos familiares que lo registrados. Los alimentos se examinan para determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* a fin de confirmar que este es el agente causante de enfermedades transmitidas por alimentos. (22) El principal factor de virulencia de *Staphylococcus spp.* involucrado en la IAE (intoxicación alimentaria estafilocócica) es la producción de enterotoxinas termorresistentes. (24)

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena que produce una toxina resistente al calor. Habita principalmente en la mucosa nasal, con menor frecuencia en la nasofaringe y piel del humano. En la mucosa nasal el microorganismo habita de manera natural sin causar enfermedad, en la nasofaringe produce infecciones como faringitis, sinusitis o gripe; la mayoría de los individuos son portadores, su presencia en la piel de la cara y manos proviene de la mucosa nasal del propio individuo, en donde persiste sin reacción aparente o bien causando lesiones piógenas cutáneas. También se localiza en el ganado vacuno y en los pollos. (25) (26) Enterotoxinas mayores a 106 ufc/gramo, causan la sintomatología del cuadro. Los pacientes se presentan con náuseas, dolor abdominal y vómitos usualmente entre 1 y 6 horas posteriores a la ingestión de alimentos contaminados. También se presenta diarrea, pero con menor frecuencia. (22)

Las conclusiones respecto a la importancia de *Staphylococcus aureus* en alimentos debe de tratarse con mucho cuidado. La presencia de una gran cantidad en los alimentos puede indicar una manipulación o condiciones sanitarias deficientes. Sin embargo, no es suficiente evidencia para aseverar que un alimento sea la causa de envenenamiento. Se debe demostrar que *S. aureus* aislado produce enterotoxinas. Las cepas del género *Staphylococcus* que producen intoxicación alimentaria pertenecen a la especie *S. aureus*, casi todas las cepas de esta especie elaboran una enzima denominada coagulasa, de allí que una de las principales pruebas para determinar la presencia de esta bacteria es la coagulasa utilizando plasma de conejo. Los reportes indican que la contaminación del alimento ocurre después de la cocción, dado que la bacteria se halla en números mayores y raras veces iguales a la dosis infectante. (18)

- **Forma de contaminación:** Las principales fuentes de contaminación de los alimentos es el humano y los animales. El humano al estar infectado o ser portador lo transmite a los alimentos durante la elaboración, en el caso de la contaminación por los animales la situación más frecuente es la mastitis crónica o aguda del ganado lechero, la contaminación es a través de las maquinas ordeñadoras o de las manos de los ordeñadores del ganado. Otros factores que contribuyen a la contaminación son el manejo inapropiado y la conservación en condiciones inadecuadas de los alimentos favoreciendo el desarrollo de los

microorganismos. El crecimiento de *S. aureus* en alimentos tiene gran importancia por tratarse de un microorganismo capaz de producir toxinas que al ingerirse causa intoxicaciones alimentarias. (26)

- **Sintomatología:** El periodo de incubación oscila entre 30 minutos y 6 horas, se presenta náusea, vómito, dolor abdominal y diarrea. El período de incubación y la sintomatología dependen de la cantidad de toxina ingerida y de la susceptibilidad del individuo. (26) La duración del cuadro es habitualmente menos de 2 días. La causa más frecuente de contaminación es el contacto directo con manipuladores de alimentos portadores de la bacteria o contaminación de los productos. Se estima que 25% de la población tiene portación nasal de esta bacteria. Los productos más relacionados son: carnes y productos derivados no refrigerados, huevos y productos de aves de corral, ensaladas como papas, tomates y huevos. El tratamiento es de soporte, con antieméticos e hidratación endovenosa si se requieren. En los casos de brotes se debe efectuar investigaciones epidemiológicas que lleven a la identificación de la fuente de origen. (27)
- **Medidas preventivas:** Cuando el microorganismo llega al alimento se debe controlar la temperatura de refrigeración y no romper la cadena del frío, de esta manera el microorganismo no será capaz de reproducirse y formar la toxina, si, por el contrario, las condiciones lo permiten, el microorganismo se desarrollará en el alimento y producirá la toxina ocasionando intoxicación cuando se ingiera. Otra medida de control es la de los manipuladores de los alimentos, deben usar cofia, cubreboca y asegurarse de que se utilicen adecuadamente. (26)
- **Principales alimentos involucrados:** Los alimentos perecederos que se identifican con mayor frecuencia en los brotes de intoxicación, consisten en jamón, salchichas, productos de pastelería, alimentos cocinados a base de carne de pollo, pavo y res, en los productos lácteos principalmente los quesos frescos, en el huevo y diversas ensaladas. (26) Los alimentos contaminados son principalmente productos de confitería, dulces y bocadillos, así como también pasteles de crema natillas ya que tienen presión osmótica alta por su contenido de azúcar y también por presentar zonas de escasa humedad que siguen siendo adecuadas para el crecimiento de estafilococos. Otro alimento de alto riesgo es el jamón que contiene muchas sales como conservantes o saborizante, estos aditivos para el curado inhiben más a los microorganismos competidores que a los estafilococos. En términos generales, se espera que los estafilococos vivan, al menos en número escaso en cualquier alimento de origen animal o en aquellos que son manipulados directamente por las personas, a no ser que se apliquen fases de tratamiento térmico para llevar a cabo su destrucción. (18)

- **Dosis infectante:** La dosis infectiva es de menos de 1 microgramo, producido cuando la concentración de la bacteria en el alimento excede de 100.000 organismos por gramo de alimento analizado. Este nivel es indicativo de malas condiciones sanitarias durante los procesos de elaboración del alimento. En población sensible, la ingestión de entre 100-200 nanogramos de enterotoxina puede causar los primeros síntomas de la enfermedad. (28)
- **Medios de aislamiento:** En los medios de cultivo tradicionales la mayoría de las especies crecen después de incubarse durante 18-24 horas, formando colonias de 0.5-1.5 mm de diámetro. Se diferencia de las demás especies por producir coagulasa que se manifiesta por su capacidad para coagular el plasma, es resistente al calor, a la desecación y puede crecer en medios con grandes cantidades de NaCl (7,5%). *S. aureus* crece bien en medios de cultivos no selectivos, como el agar sangre, agar chocolate, cerebro corazón infusión agar (BHI, por sus siglas en inglés) y medios líquidos para hemocultivo donde se recupera fácilmente. (29) En la actualidad gozan de gran aceptación los medios que contienen yema de huevo junto a uno o más agentes selectivos antes señalados, en estos medios, la mayoría de las cepas de *S. aureus* utilizan la lipoproteína de la yema de huevo conocida como lipovitelina lo que da lugar a que en torno y debajo de las colonias, aparezcan áreas de aclaramiento. Otro carácter propio de las reacciones en yema de huevo es la aparición de un precipitado blanco en las áreas total o parcialmente aclaradas que es debido a la formación de sales de calcio y magnesio de los ácidos grasos liberados. A pesar de que estas reacciones son características de *S. aureus*, hay cepas de estafilococos coagulasa positivas que no las presentan. Dentro de los medios más comunes para el recuento de estafilococos coagulasa positivos tenemos el Agar Baird Parker, este medio es altamente selectivo, no inhibe a los estafilococos estresados y permite el fácil reconocimiento de las colonias de *S. aureus*. Este medio de cultivo contiene cloruro de litio y Telurito para la inhibición de la flora acompañante en tanto que el Piruvato y la Glicocola actúan favoreciendo selectivamente el crecimiento de *Staphylococcus*. (18)

2.2.6.3.2. *Salmonella* y enfermedades asociadas

Los miembros del género *Salmonella* son agentes causantes de infección intestinal en seres humanos y animales. Entre los agentes de enfermedades transmitidas por los alimentos, el género *Salmonella* es uno de los principales causantes de casos mortales por las complicaciones surgidas entre los pacientes afectados. La tasa de mortalidad se sitúa alrededor del 4,1% y los huevos, carnes y productos cárnicos derivados, son los alimentos que más comúnmente transmiten la *Salmonella* al hombre. El hábitat principal de los microorganismos de este género es el conducto intestinal del ser humano, de los animales domésticos, de los pájaros, de los reptiles y, ocasionalmente, de los insectos. Debido a que es una bacteria de origen intestinal, es excretada por las heces que contaminan el ambiente y las aguas, cuando las aguas contaminadas o los alimentos contaminados son ingeridos por el

ser humano o por los animales, el microorganismo vuelve al sistema digestivo donde se multiplica y será nuevamente eliminado a través de las heces, continuando el ciclo, los insectos y roedores también participan en la diseminación ambiental de estos microorganismos. La dosis infectante es variable, según el serotipo; en general, el número de células necesarias para desencadenar la sintomatología (náusea, vómitos, dolores abdominales, cefaleas escalofríos y diarreas) oscila entre 10^3 y 10^6 UFC/g de alimento para algunos serotipos y entre 10^9 y 10^{11} para otros. Cerca de 5% de las personas que sufren la enfermedad, siguen siendo portadoras por tiempo considerable y pasan a ejercer un importante papel en la diseminación del agente, especialmente si participan en la cadena de producción y comercialización de alimentos. (22)

En la actualidad la salmonelosis es la principal causa de las ETAs en la mayoría de los países desarrollados y en los subdesarrollados, una de las más importantes causas de muertes. *Salmonella*, en el ámbito mundial, está asociada con la enfermedad diarreica aguda (EDA), la cual continúa siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad sobre todo en lactantes, niños y ancianos. (30)

- **Características del género:** Este género ha sido extensamente estudiado, especialmente en alimentos, de los cuales suele aislarse y su descripción corresponde al típico bacilo Gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Móviles y algunos serovares inmóviles con flagelos peritricos que rodean al microorganismo y no desarrolla cápsula ni espora. Producen sulfuro de hidrógeno (H_2S). Fermentan glucosa, pero no lactosa, y no producen ureasa, con una rica composición antigénica que se emplea como base para la identificación de sus miembros en serotipos, o serovares. (19)
- **Clasificación o agrupación:** Con fines epidemiológicos la OMS considera que se le puede agrupar en tres grupos:
 - a) Los que afectan solamente a personas: incluyendo a *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella paratyphi B* *Salmonella paratyphi C*.
 - b) Los que pueden adquirirse por consumir alimentos: *Salmonella gallinarum*, *Salmonella dublin*, *Salmonella abortus-equis*, *Salmonella abortus-ovis* y *Salmonella Cholerae –suis*.
 - c) Serovares inadaptados (sin preferencia de hospedador) son patógenos para humanos y otras especies animales, e incluye a la mayoría de las serovares transmitidos por alimentos.
- **Hábitat y fuentes de aislamiento:** Como fiel representante de la familia enterobacteriaceae, esta se encuentra de forma parásita en el tracto intestinal de animales y el hombre; siendo este solo un eslabón de la cadena contaminante. Esta se libera al medio ambiente a través de los desechos fecales de animales y del hombre, permanece activa en los materiales con los cuales tiene contacto e inclusive se puede multiplicar cuando existen las condiciones

favorable: como el pH, la temperatura, actividad del agua, potencial de óxido-reducción, exposición a agentes germicidas, la composición del material en que se encuentra y la humedad ambiental, tal es el caso especial de los alimentos; como lo son las carnes, verduras, algunas frutas y una gran variedad de alimentos, en los cuales dichas condiciones se cumplen perfectamente. No siempre la contaminación fecal es el antecedente único y directo de casos o brotes de salmonelosis humana, tal es el caso de huevos de aves puestos incluso en condiciones sanitarias que excluyen la presencia de materia fecal, puede ser portadores del patógeno. (19)

La sobrevivencia en el medio ambiente es muy significativa, claro ejemplo es el suelo; a pesar de que su tendencia natural es a ser inactivada en este material, se sabe que el germen puede ser recuperado del 90% de muestras de lodos de cloacas y sobrevivir 72 semanas en los terrenos en donde estos se descargan. Así mismo el agua es una fuente de especial sobrevivencia y transmisión, ya que ninguna agua natural sobre la superficie de la tierra se puede considerar libre de este microorganismo. Se han presentado casos en que ha sido aislada en áreas boscosas con nula actividad humana y en condiciones pocamente propicias para su desarrollo. (19)

De manera natural al igual que en agua y suelo, los vegetales y frutas se pueden contaminar con *Salmonella*, ya sea directa o indirectamente con materia fecal animal o humana. Este tipo de alimentos reúnen las características propuestas para ser clasificados como alimentos de alto riesgo, ya que son alimentos mínimamente procesados, que se consumen crudos, su preparación al ser consumidos implica el contacto directo con las manos, el pH permite el desarrollo o facilita la sobrevivencia de patógenos, no suelen utilizarse ningún agente germicida que asegure la eliminación del patógeno, etc. Así mismo es de mucha importancia conocer que la *Salmonella* no requiere componentes especiales en los alimentos para desarrollarse. (19)

Los principales reservorios de *Salmonella* son las aves de corral, el ganado bovino y el porcino. Por lo tanto, son fuentes de infección las carnes de estos animales y los huevos. El hombre también es reservorio de esta bacteria lo que revela la importancia de considerar a los manipuladores de alimentos portadores como fuente de infección. También se han identificado como fuentes de infección los vegetales frescos consumidos crudos en ensaladas. (31)

- **Dosis infectiva:** La exposición previa de la bacteria a condiciones de acidez subletales por ejemplo en la mayonesa, podría facilitar su resistencia a la acidez gástrica en comparación con células que hayan sido preexpuestas a elevadas temperaturas. Como consecuencia de los múltiples factores que influyen su infectividad, existe una gran variabilidad en las

estimaciones de dosis infectivas aunque comúnmente se acepta que oscila entre 10⁶ y 10⁸ unidades formadoras de colonias. A pesar de los valores comúnmente aceptados, los resultados de la investigación de diversos brotes asociados a diferentes alimentos demuestran que en ocasiones las dosis infectivas pueden ser mucho menores. En el caso de *Salmonella* Enteritidis durante la investigación de un brote a partir de helado contaminado en EEUU la dosis infectiva se estimó como no superior a 28 células. En Alemania, en un brote asociado con pimienta y patatas fritas picantes contaminados con múltiples serotipos la dosis infectiva se estimó entre 4 y 45 organismos. En cuanto a *Salmonella* Typhimurium, en un brote por consumo de queso contaminado, la dosis infectiva se estimó como no superior a 10 organismos. Reflejando la variabilidad en dosis infectivas y la posibilidad de que esta sea muy baja en ciertas ocasiones, la Food and Drug Administration considera que la dosis infectiva es tan pequeña como entre 15 y 20 células; dependiendo de la edad y estado de salud del hospedador y diferencias entre serotipos. (32)

- **Enfermedades producidas:** La salmonelosis humana es una enfermedad infectocontagiosa, comprende un conjunto de cuadros clínicos, donde una de las principales manifestaciones es la gastroenteritis aguda, una de las intoxicaciones alimentarias más comunes causadas por agua y alimentos contaminados. La *Salmonella* no causa solamente un padecimiento o síndrome clínico, esto dependerá del tipo de serovar que realizó la infección, cada uno presentará manifestaciones propias de su comportamiento, virulencia, capacidad invasiva, etc.

Se puede presentar:

- **Enteritis:** En donde los síntomas principales son, fiebre ligera, náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea durante unos pocos días, pero, en algunos casos puede persistir durante una semana o más; mialgias y dolor de cabeza son comunes. El periodo de incubación puede ser de las 12-48 después de la ingesta, o ser entre 6-48 horas, con un promedio de 12 a 36 horas y habitualmente, el trastorno es leve o asintomático y persiste de 1 a 4 días, el tratamiento incluye reposición de líquidos y sales; no se aconsejan antibióticos, ya que prolongan la excreción del microbio. Este es el tipo de salmonelosis más corriente con una mortalidad de 0,1 % a 0,2 % y con grupos edad más afectados a los niños y ancianos. (19)
- **Enfermedad sistémica:** Enfermedad infecciosa sistémica provocada por *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*, los cuales son más invasivos. Esta enfermedad es conocida como fiebre tifoidea, y posee un periodo de incubación de 3 a 56 días, aunque está comprendida entre 10 y 20 días.
- **Colonización asintomática:** Luego de darse la enfermedad sintomática, la *Salmonella* es mantenida en los portadores humanos, entre el 1 y 5 % de los pacientes experimentan

colonización crónica durante más de un año. Estos portadores pueden difundir la enfermedad y producir brotes. (19)

- **Aislamiento y selección de *Salmonella*:** Para realizar el aislamiento e identificación de *Salmonella* se utilizan primeramente los medios de enriquecimiento, los cuales ayudan a su desarrollo, ejemplo de ellos son: Caldo tetracionato, Rappaport o caldo selenito. En el caso de estos medios, inhiben la replicación de ciertas bacterias y permiten la multiplicación de las *Salmonellas*, debido a que son resistentes a ciertas sustancias como el tetracionato, componente de unos de los caldos antes mencionados. Luego de realizar el enriquecimiento para que la bacteria se desarrolle se hace uso de medios selectivos de cultivo; como Agar *Salmonella-Shigella*, Bismuto-selenito y Rámbach, luego de aislar el microorganismo sospechoso se realiza la identificación por medio de pruebas bioquímicas y los resultados obtenidos son comparados con la tabla respectiva para concluir con los resultados, por último, se realizan pruebas de aglutinación con suero específico. (19)
- **Prevención:** Las principales causas de infección son los alimentos crudos o que hayan sufrido cocción insuficiente, además de la contaminación cruzada que ocurre cuando los productos cocidos entran en contacto con alimentos crudos o con superficies o materiales contaminados (como las tablas para cortar). Por lo tanto, la cocción adecuada y la higiene durante la manipulación de los alimentos pueden prevenir en gran medida las infecciones causadas. (31)

2.2.7. Adhesión microbiana

La adhesión a las superficies permite a los microorganismos establecer una base desde la cual penetrar en los tejidos. Entre los factores que determinan la adherencia, se encuentran las adhesinas (moléculas microbianas que median la unión a las células) y los receptores del huésped a los cuales se unen estas moléculas. Los receptores del huésped incluyen residuos de azúcares en la superficie y proteínas de superficie (por ejemplo, la fibronectina), que favorecen la unión de ciertos microorganismos Gram positivos (como los estafilococos). Otros determinantes de la adherencia son unas estructuras finas de ciertas paredes bacterianas (como las de los estreptococos), llamadas fibrillas, por medio de las cuales algunas bacterias se unen a las células epiteliales humanas. Otras bacterias, como las *Enterobacteriaceae* (por ejemplo *Escherichia coli*), tienen orgánulos de adhesión específicos llamadas fimbrias o pili. Las fimbrias le permiten al microorganismo unirse a casi todas las células del cuerpo humano, incluidos neutrófilos y células epiteliales del tubo digestivo, la boca y el intestino. (33)

- **Biopelícula:** La biopelícula es una capa viscosa que se forma alrededor de algunas bacterias, y que les confiere resistencia a la fagocitosis y a los antibióticos. La mayoría de las células se pueden adaptar porque se adhieren a superficies con presencia de sustratos, que generalmente están contenidos dentro de una matriz orgánica polimérica de origen microbiano. Una biopelícula se considera como una matriz biológicamente activa formada por células de una o varias especies y sustancias extracelulares en asociación con una superficie sólida, incluyendo superficies minerales, tejidos vivos o muertos de animales o plantas, polímeros sintéticos, cerámicas y aleaciones de metales. Las biopelículas que se encuentran en la naturaleza consisten en comunidades de microorganismos primarios viables y no viables protegidos por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) polianiónicas fijadas a la superficie. Las EPS pueden contener polisacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos, ácidos teicoicos y otras sustancias poliméricas hidratadas con un porcentaje de agua entre 85 y 95%. Las EPS protegen a los microorganismos que hacen parte de la biopelícula contra agentes antimicrobianos, previenen al acceso de biocidas, secuestrantes metálicos, toxinas, evitan la deshidratación, refuerzan la resistencia de la biopelícula al estrés ambiental y permiten a los microorganismos capturar los nutrientes. Los vegetales frescos han sido identificados como medios de transporte de bacterias patógenas altamente importantes en salud pública, tales como *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, entre otros. Las bacterias no patógenas pueden constituir comunidades de biopelículas en vegetales como lechuga y tomate y los microorganismos potencialmente patógenos pueden llegar a ser retenidos y protegidos dentro de estas biopelículas. Por el contrario de las células planctónicas, las biopelículas bacterianas sobre las superficies de las plantas son más resistentes a los sanitizantes y detergentes, lo que se atribuye a la producción de enzimas que degradan las sustancias antimicrobianas. Se demostró, que ácido láctico al 0.2%, seguido de cloro a 200ppm y cloruro de lauril dimetil bencil amonio al 0,1mg/ml fue el tratamiento de sanitizantes más eficiente con reducciones de 5.08, 4.7 y 4.21 log ufc en tomates contaminados con *Y. enterocolitica*. Este tratamiento puede ser efectivo en la reducción de poblaciones de *E. coli* y *Y. enterocolitica* en vegetales dependiendo del tamaño de inóculo, tipo de vegetal y el tiempo transcurrido entre la sanitización y el consumo. La FDA (Food and Drug Administration) ha propuesto que los tratamientos con sanitizantes en vegetales frescos deben ser capaces de reducir la carga de patógenos a mínimo 5 log ufc sin afectar las características sensoriales del producto tratado. (34)

Factores intervinientes:

- **Condiciones de la superficie:** La superficie sólida puede tener varias características que son importantes para el proceso de adhesión. La colonización microbiana se incrementa cuando la rugosidad de la superficie aumenta y el área de superficie es mayor. Las propiedades fisicoquímicas de la superficie pueden influir mucho en la adhesión microbiana, muchos

investigadores han encontrado que la adhesión microbiana es más rápida en superficies hidrófobas como teflón y otros plásticos que sobre materiales hidrofílicos como el vidrio o metales. (35)

- *Especies bacterianas:* Las bacterias pueden colonizar una amplia variedad de superficies en ambientes bióticos o abióticos habitados por formas superiores de vida y espacios adversos; su habilidad para persistir en la biósfera obedece en parte a su versatilidad metabólica y su plasticidad genotípica. Además, la superficie hidrófoba de la célula, la presencia de fimbrias y flagelos y la producción de exopolisacáridos (EPS), influyen en la capacidad de las células microbianas para adherirse. La hidrofobicidad de la superficie celular es importante para la adhesión ya que las interacciones hidrófobas tienden a incrementarse cuando aumenta la despolaridad natural entre uno o ambas superficies involucradas (superficie celular y el sustrato de la superficie). Las fimbrias y flagelos aparte de estar involucrados en la transferencia de virus o ácidos nucleicos bacterianos, contribuyen dando hidrofobicidad a la superficie celular ya que muchas de ellas contienen aminoácidos hidrófobos. Por otra parte se sabe que las células inmóviles no recolonizan las áreas de un sustrato como lo hacen las células móviles, resultando más lenta la formación de un biofilm por las células inmóviles. Los flagelos aparentemente tienen un papel importante en las primeras etapas de la adhesión bacteriana al vencer las fuerzas de repulsión asociadas con el sustrato. La adhesión de los microorganismos a las superficies es un proceso muy complejo, con muchas variables que afectan su éxito. En general, la adhesión puede ocurrir más fácilmente en superficies rugosas, muy hidrófobas, y cubiertas por una película. (35)
- *Factores medioambientales:* Otras características del medio acuoso como son el pH, cantidad de nutrientes, cargas iónicas, temperatura y fluidez pueden jugar un papel importante en la adhesión bacteriana al sustrato. Varios estudios muestran el efecto de los medios acuosos sobre la adhesión bacteriana y la formación del biofilm. El incremento de la concentración de nutrientes en el medio está relacionado con el incremento del número de células bacterianas adheridas, de igual manera la velocidad de las turbulencias fluctuantes en el medio puede afectar la formación del biofilm. (35)

2.2.8. Tipos de muestras

Una muestra consiste en una o más unidades de producto extraídas de un lote, las unidades de muestra son seleccionadas al azar sin tomar en cuenta su calidad. El número de unidades de producto contenidos en la muestra es el tamaño de muestra. (22).

- a) **Muestra no representativa:** Se toma con fines de investigación en laboratorio, utilizando la técnica de muestreo casual y en cantidades mínimas. Esta muestra se toma con la finalidad de: prevenir infracciones de la ley. Cuando se muestrean en locales de producción,

en las diferentes fases de transformación como en producto terminado que aún no está comercializado o puede estar en comercio. También se realiza con la finalidad de apoyar a los productores a mejorar la calidad de los alimentos y preservar al mismo tiempo la salud pública. Estas muestras no representan o no reflejan las características del lote. Sería un error escoger de un lote solo las muestras deteriorada, el inspector también debe escoger muestras buenas. (22)

- b) **Muestra representativa:** Se ejecuta muestreos representativos solo en casos particulares, esto es cuando después de un control previo, surgen algunas dudas como la calidad de la partida o lote. La toma de muestra representativa puede ser motivada principalmente por razones de carácter higiénico sanitario o para determinar la calidad del producto. Estas muestras representan reflejan las características del lote. (22)

2.2.9. Técnicas de muestreo

La toma de muestra se realiza considerando a los productos de mayor riesgo epidemiológico, de acuerdo a los productos de mayor preferencia por los consumidores. Entre los alimentos considerados de alto riesgo para la salud del consumidor son aquellos con excesiva manipulación, ejemplo ceviche de pescado, mariscos, ensaladas de verduras, salsa, ají a base de queso, carnes, leches, refrescos, etc. La cantidad de muestra a recogerse deberá ser de 100 a 200 g o mL. La recolección de la muestra se debe llevar a cabo en las mismas condiciones en que es distribuido en el punto de venta. Deben ser recolectadas en frascos, en bolsas estériles y debidamente identificadas, deben acondicionarse en cajas refrigerantes con paquete de hielo. El transporte de las muestras al laboratorio deberá efectuarse en el menor tiempo posible.

De acuerdo al tipo de estudio que se esté realizando será necesario llenar formularios con el nombre del lugar de muestreo, de los manipuladores, entre los datos del alimento se debe considerar lo siguiente:

- La hora en que fue preparada.
- Tiempo aproximado de exposición del alimento.
- Temperatura aproximada a la que se ha mantenido.
- Fecha y hora de muestreo.
- Lugar de recolección de la muestra.

(22)

2.2.10. Enfermedades asociadas al consumo de verduras y hortalizas

Durante las últimas décadas, diferentes investigaciones científicas han demostrado que una dieta rica en frutas y hortalizas ofrece una protección contra muchas formas de cáncer y

reduce la ocurrencia de enfermedades coronarias. Esto, junto con el poco tiempo con que cuenta gran parte de la población para cocinar en días laborales sus alimentos, ha incrementado el consumo de ensaladas en restaurantes de comida rápida. Sin embargo, se ha informado de una serie de casos en los cuales los productos frescos son el vehículo de transmisión de enfermedades, producidas por diferentes microorganismos. (23)

La lechuga, repollo, apio y otros vegetales que generalmente se consumen crudos han sido asociados con brotes epidémicos de diarrea. La contaminación microbiológica de estos alimentos toma mayor importancia al considerar que el tiempo de supervivencia de los microorganismos patógenos puede ser prolongado, semanas o meses, particularmente cuando los microorganismos están en las áreas del vegetal más húmedas y protegidas de la desecación y de los rayos directos del sol, como ocurre en la lechuga, repollo, zanahoria y rábano. Diversos estudios de campo y laboratorio, han mostrado que los patógenos inoculados en la tierra de cultivo o en las aguas de irrigación de vegetales pueden sobrevivir hasta por dos meses, período suficiente para que alcancen en forma viable al consumidor. (23)

2.2.11. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades transmitidas por alimentos se definen como “El conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o alimentos que contengan agentes biológicos (ejemplo, bacterias o parásitos) o no biológicos (ejemplo, plaguicidas o metales pesados) en cantidades tales que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de grupo de personas”.

Existen numerosos tipos de ETA que presentan diferentes sintomatologías, dependientes del tipo de contaminación y de la cantidad de alimento contaminado consumido. Los signos más comunes son vómitos y diarreas, pero también pueden presentarse dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, síntomas neurológicos, visión doble y otros. Además, ciertas ETAs pueden generar enfermedades crónicas a largo plazo tales como daños renales, artritis, meningitis, aborto y, en casos extremos, la muerte. (4).

Las ETAs constituyen uno de los problemas más extendidos en el mundo actual y una causa importante de disminución de la productividad para países, empresas, familias e individuos, por su magnitud, tendencia creciente, emergencia y reemergencia, aparición de nuevos escenarios epidemiológicos y formas de transmisión, incremento de la resistencia antimicrobiana e impacto social y económico. (5)

Se dividen en dos grandes grupos:

- a) **Infecciones alimentarias:** son las ETAs producidas por la ingestión de alimentos y/o agua contaminados con agentes infecciosos específicos tales como bacterias, virus,

hongos, parásitos, que en la luz intestinal pueden multiplicarse o lisarse y producir toxinas o invadir la pared intestinal y desde allí alcanzar otros aparatos o sistemas.

b) Intoxicaciones alimentarias: son las ETAs producidas por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas, animales o producidas por microorganismos o sustancias químicas o radioactivas que se incorporan a ellos de manera accidental, incidental en cualquier momento desde su producción hasta su consumo. (36).

Los diferentes tipos de intoxicaciones son:

- *Intoxicaciones alimentarias naturales*, ocurren por el consumo de alimentos de origen animal o vegetal que en su estado natural poseen sustancias altamente tóxicas. Por ejemplo, la intoxicación animal paralizante ocurre por el consumo de mariscos bivalvos crudos contaminados o por el consumo de pescado que contiene una toxina mortal.
- *Intoxicaciones de origen microbiano*, ocurren por el consumo de alimentos contaminados por toxinas producidas por bacterias y hongos patógenos, parásitos y virus. (ej.: *Salmonella*, virus de la Hepatitis A, *Triquinella spirallis* toxina botulínica, enterotoxina de *Staphylococcus*).
- *Intoxicaciones por plaguicidas*, generalmente ocurren por la ingestión de compuestos organoclorados y organofosforados en frutas y verduras o por mal uso durante el almacenamiento o el acondicionamiento y la desinfección de bodegas y camiones.
- *Intoxicaciones por otros elementos químicos*, como arsénico, cadmio, cromo, manganeso, mercurio, nitratos, nitritos, plomo, talio, mercurio, cobre, selenio, níquel y litio, ya sea en el agua, en los productos cárnicos o en los recipientes metálicos. (4)

Dentro de las bacterias de nuestro interés responsables de las enfermedades transmitidas por alimentos tenemos *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Síntomas: Los síntomas de las ETA pueden durar algunos días e incluyen vómitos, dolores abdominales, diarrea y fiebre. También pueden presentarse síntomas neurológicos, ojos hinchados, dificultades renales, visión doble, etc. La duración e intensidad de los síntomas varía de acuerdo a la cantidad de bacterias o toxinas presentes en el alimento, a la cantidad de alimento consumido y al estado de salud de la persona, entre otros factores. (4)

Grupos vulnerables: Existen grupos como los niños, los ancianos y las mujeres embarazadas que, por su baja resistencia a las enfermedades, son especialmente vulnerables. En estos casos las precauciones deben extremarse, pues las consecuencias de las ETA pueden ser severas, dejando secuelas o incluso hasta provocando la muerte. Por el contrario, para las restantes personas los síntomas son pasajeros: en la mayoría de los casos, sólo duran un par de días, sin ningún tipo de complicación. (4)

2.2.12. Contaminación cruzada de alimentos

La contaminación cruzada de alimentos es causa muy frecuente del transporte de gérmenes entre productos y se presenta especialmente: Cuando se transportan de manera incorrecta alimentos crudos con otros ya procesados, al almacenar los productos procesados o semiprocesados con alimentos crudos, cuando una manipulación inadecuada de productos crudos y procesados se manipulan unos y otros con las manos, o con utensilios sin higienizar. (2)

Este tipo de contaminación se entiende como el paso de cualquier contaminante (bacteria, producto químico, elemento físico), desde un alimento o materia prima contaminados a un alimento que no lo está a superficies en contacto con este, que se encuentran limpias (mesas, equipos, utensilios). Este mecanismo casi siempre ocurre de manera imperceptible y se da por ejemplo, cuando en la heladera el goteo de las carnes cae sobre alimentos listos para consumir. Las formas más frecuentes de contaminación cruzada se dan cuando el manipulador permite el contacto de un alimento crudo con uno cocido listo para consumir, por ejemplo, si se corta con un cuchillo un pollo o carne crudos y con el mismo cuchillo sin lavar se corta un alimento listo para consumir. El problema más relevante con la contaminación, en especial la producida por bacterias, es que resulta imposible detectarla por medio de los sentidos. De esa manera, resulta imposible “ver” las bacterias o su reproducción. Solo en algunos casos podría haber evidencias como el olor que podría por denotar una posible contaminación por plaguicidas por ejemplo, o la presencia de objetos extraños como un pedazo de vidrio o un tornillo. (37)

2.2.13. Buenas prácticas de higiene para ensaladas

La adecuada manipulación de los alimentos, desde que se producen hasta que se consumen, incide directamente sobre la salud de la población. El profesional de la alimentación tiene la responsabilidad de respetar y proteger la salud de los consumidores por medio de una manipulación cuidadosa. Algunas de las prácticas higiénicas más importantes son:

- a) Lavado de manos, muñecas y uñas cada vez que el manipulador cambie de actividad y manipule nuevamente un alimento, o algún equipo que esté en contacto con él.
- b) Usar un tipo de ropa exclusivo para el trabajo y que no haya tenido contacto con otros ambientes.
- c) Guardar la ropa y el calzado de trabajo separados del de la calle.
- d) No usar joyas ni relojes a la hora de la manipulación de los alimentos, ya que pueden acumular suciedad y organismos contaminantes.
- e) Emplear guantes para disminuir la difusión bacteriana, pero hay que tener cuidado que no estén gastados.

- f) Proteger con cubiertas impermeables las posibles heridas que el manipulador pueda tener en las manos, evitando así su contacto con los alimentos.
- g) No toser, ni comer, ni mascar chicle durante la manipulación de alimentos.
- h) No hablar sobre los alimentos, ya que así se pueden liberar sobre éstos pequeñas partículas de saliva, con su correspondiente carga microbiana.
- i) No manejar utensilios sucios, no recoger del suelo instrumentos caídos sin lavarse las manos a continuación y seguir con la preparación y servicio de alimentos.
- j) No tocarse la nariz, la boca, los oídos, ojos, o rascarse la cabeza u otras zonas donde pueden existir gérmenes.
- k) No usar utensilios que tengan mangos de madera.
- l) No usar trapos, bayetas, etc. Sólo toallas de un solo uso.
- m) No colocar bandejas y recipientes con alimentos, directamente en el suelo.
- n) Si por accidente el alimento cae al suelo, habrá que eliminar la parte que lo ha tocado, y en ningún caso vuelva a utilizarlo para la elaboración.
- o) No recongelar alimentos descongelados.
- p) Mantener los alimentos cocinados para su consumo inmediato, sometidos a la acción del calor, asegurando una temperatura superior a los 70 °C en el centro de su masa, hasta el momento de servirlos. (2)

Salud del personal: La administración del restaurante o servicios afines es el responsable del control médico periódico de los manipuladores de alimentos que trabajan en dichos establecimientos. No debe permitirse aquellos que padecen enfermedades infecto contagiosas, diarreas, heridas infectadas o abiertas, infecciones cutáneas o llagas, continúen con la manipulación de alimentos, hasta que se verifique el buen estado de salud. (18)

Higiene y hábitos del personal: Los manipuladores de alimentos deben mantener una esmerada higiene personal, especialmente en el lavado de manos, de la siguiente forma:

- a) Antes de iniciar la manipulación de alimentos.
- b) Inmediatamente después de haber usado los servicios higiénicos.
- c) Después de toser o estornudar utilizando las manos o pañuelo.
- d) Después de rascarse la cabeza u otra parte del cuerpo.
- e) Después de manejar cajas, envases, bultos y otros artículos contaminados.
- f) Después de manipular alimentos crudos como carnes, pescados, mariscos, etc.
- g) Después de barrer, trapear pisos, recoger y manipular los recipientes de residuos, limpiar mesas del comedor, tocar dinero y, todas las veces que sea necesario.

(18)

Vestimenta: Los manipuladores de alimentos (del área de cocina) deben usar ropa protectora de color blanco que les cubra el cuerpo. Llevar completamente cubierto el cabello y tener el

calzado apropiado. Toda la vestimenta debe ser lavable, mantenerla limpia y en buen estado de conservación, a menos que sea desechable. El resto del personal debe usar ropa protectora mantenida en buen estado de conservación e higiene. Los operarios de limpieza y desinfección de los establecimientos deben usar delantales y calzados impermeables. (18)

2.3. Marco conceptual

Agentes microbianos: Son los microorganismos de vida útil, indicadores y patógenos señalados en la disposición.

Alimento apto para consumo humano: Alimentos que cumplen con los criterios de calidad sanitaria e inocuidad establecidos por la norma sanitaria.

Alimento elaborado: Son todos aquellos preparados culinariamente, en crudo o precocidos o cocinado, de uno o varios alimentos de origen animal o vegetal, con o sin la adición de otras sustancias, las cuales deben estar debidamente autorizadas. Podrá presentarse envasado o no y dispuesto para su consumo.

Alteración de alimento: Cuando tiene modificadas sus características organolépticas y no son aptos para su consumo, sin que ello suponga siempre que sean peligrosos para la salud.

Calidad sanitaria: Es el conjunto de requisitos microbiológicos, físicoquímicos y organolépticos que debe reunir un alimento para ser considerado apto para el consumo humano.

Coliformes: Comprenden *E. coli* y *Aerobacter aerogenes*, ambos organismos son bacilos cortos, Gram negativas, anaerobios facultativos, con una temperatura óptima de 30 a 37 °C fermentan la lactosa con producción de ácido láctico y otros ácidos orgánicos, anhídrido carbónico e hidrógeno, descomponen las proteínas de la leche dando lugar a un olor y sabor desagradables.

Contaminación: Inclusión, en el medio ambiente o en los animales, de microorganismos o sustancias nocivas que provocan trastornos en los organismos vivos o en el hombre.

Criterios microbiológicos: Define la aceptabilidad de un producto o un lote de un alimento basado en la ausencia o presencia en cantidad de microorganismos por unidad de masa, volumen, superficie o lote.

Higiene: Conjunto de conocimientos y técnicas que aplican los individuos para el control de los factores que ejercen o pueden ejercer efectos nocivos sobre su salud.

Hortaliza: Es el componente comestible de una planta que incluye, tallos, raíces, tubérculos, bulbos, flores y semillas.

Infeción: Penetración y desarrollo de agentes patógenos en los tejidos de un huésped, ocasionándole efectos nocivos.

Inocuidad: Garantía de que los alimentos no causaran daño al consumidor cuando se fabriquen, preparen y consuman de acuerdo al uso a que se destina.

Intoxicaciones: Condición o estado físico producido por la ingestión, inyección, inhalación o exposición a una sustancia tóxica.

Muestra: Una muestra consiste en una o más unidades de producto extraído de un lote. Es definida como la fracción de un material sobre la que se estudian ciertas características que posteriormente se generalizan a todo el conjunto.

Muestreo: Acción organizada de extraer una muestra para su análisis. Se muestrea para obtener una muestra representativa de todas las unidades del lote, es decir una versión simplificada de la población que reproduzca de algún modo sus rasgos básicos; con el propósito de aceptar o rechazar dicho lote.

Patógeno: Todo agente biológico externo que se aloja en un ente biológico determinado, dañando de alguna manera su anatomía, a partir de enfermedades o daños visibles o no.

Peligro: Agente biológico, químico o físico que presente en un alimento o condición de dicho alimento, que pueden ocasionar un efecto nocivo para la salud.

Plan de muestreo: Establecimiento de criterios de aceptación que se aplican a un lote, basándose en el análisis microbiológico de un número requerido de unidades de muestra. Un plan de muestreo define la probabilidad de elección de microorganismos en un lote, se deberá considerar que un plan de muestreo no asegura la ausencia de un determinado microorganismo.

Riesgo: Función de probabilidad de que se produzca un efecto adverso para la salud y de la gravedad de dicho efecto, como consecuencia de un peligro o peligros en los alimentos.

CAPITULO III

DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Definición de variables

Para esta investigación se analizó el grado de presencia de los microorganismos indicadores de alteración, microorganismos indicadores de higiene y microorganismos patógenos que determinaron la calidad microbiológica de ensaladas elaboradas en pollerías del centro poblado Las Américas.

3.2. Operacionalización de variables

3.2.1. Indicador

Los indicadores microbiológicos están basados en las Normas Técnicas Sanitarias N° 071-MINSA/DIGESA-V.01 para ensaladas (grupo XV: alimentos preparados, subgrupo XV.1), los cuales son:

- a) Microorganismos indicadores de alteración: aerobios mesófilos.
- b) Microorganismos indicadores de higiene: coliformes y *Escherichia coli*.
- c) Microorganismos patógenos: *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.*

3.2.2. Índice /escala

Los índices determinarán la aceptación o rechazo de la calidad microbiológica de las ensaladas elaboradas en pollerías, comparando los resultados obtenidos con los parámetros establecidos por las NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01.

Tabla 3. Descripción de las variables, indicadores e índices para la evaluación de ensaladas

Definición conceptual	Variables	Indicadores	Índice	
Procedimiento para determinar la presencia, identificación y cantidad de microorganismo patógenos e indicadores de contaminación en las muestras.	Nivel de microorganismos indicadores de alteración	• Numeración de aerobios mesófilos	UFC/g	
	Calidad microbiológica de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas.	Nivel de microorganismos indicadores de higiene	• Numeración de coliformes • Numeración de <i>E. coli</i>	UFC/g UFC/g
		Nivel de microorganismos patógenos	• Numeración de <i>Staphylococcus aureus</i> • Investigación de <i>Salmonella</i>	de UFC/g Ausencia/25g

3.3. Hipótesis de la investigación

3.3.1. Hipótesis General

Los resultados obtenidos del análisis de la calidad microbiológica de ensaladas elaboradas en las pollerías del centro poblado Las Américas, no cumplen los criterios microbiológicos establecidos por las NTS.

3.3.2. Hipótesis Específicos

- Los microorganismos indicadores de alteración: aerobios mesófilos, de las muestras de ensaladas de pollerías no cumplen los criterios microbiológicos establecidos por las NTS.
- Los microorganismos indicadores de higiene: coliformes y *Escherichia coli*, de las muestras de ensaladas de pollerías no cumplen los criterios microbiológicos establecidos por las NTS.
- Los microorganismos patógenos: *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.* de las muestras de ensaladas de pollerías no cumplen los criterios microbiológicos establecidos por las NTS.

3.4. Tipo y diseño de la investigación

La investigación es de tipo básico descriptivo exploratorio de enfoque cuantitativo y comparativo, ya que se describió en todos sus componentes los indicadores que intervienen en la calidad microbiológica de ensaladas, y a partir de ello se concluyó en qué condición de calidad microbiológica se encuentran expendidos estos productos en las diversas pollerías del centro poblado Las Américas, para ello se realizó un análisis microbiológico y se comparó los resultados obtenidos con los parámetros establecido por la NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01.

El análisis microbiológico se ejecutó de acuerdo a la metodología dispuesta por la Dirección General de Salud (DIGESA), para el análisis de aerobios mesófilos y *Staphylococcus aureus*, se prosiguió con la técnica de recuento estándar en placa, para el análisis de coliformes y *Escherichia coli* se ejecutó la técnica del número más probable (NMP) y finalmente para el análisis de *Salmonella sp.* se empleó el método de ensayo de presencia/ausencia.

3.4.1. Análisis de datos

Por la naturaleza del estudio, que es de tipo observacional, analítico y comparativo se utilizó estadística descriptiva usando el procesador Statgraphics versión 13 para Windows, presentándose los resultados en tablas y gráficos de barras, se usó también el programa de Excel 2013 para el cálculo de medias y desviación estándar.

3.5. Población y muestra

3.5.1. Población

- **Naturaleza:** Las ensaladas mixtas son elaboradas en las pollerías como un acompañante del plato principal, estos son expendidos sin ningún tipo de control en su elaboración, razón por la cual constituye un riesgo para la salud pública.
- **Delimitación:** El centro poblado Las Américas, perteneciente al distrito de Abancay.
- **Espacio:** Toma de muestra de los 16 establecimientos comerciales de pollerías del centro poblado Las Américas. La evaluación experimental se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

3.5.2. Muestra

Debido a que la población de estudio es finita, ya que se cuenta con el registro de todos los elementos que lo conforman, la muestra se considera censal pues se seleccionó el 100% de la población al considerarla un número manejable de locales de pollerías. En este sentido, todas las unidades de investigación son consideradas como muestra y se precisa como censal por ser simultáneamente universo, población y muestra.

El número de unidades de muestra por establecimiento, se sujetó a la “Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano” **Artículo 10°: Número de unidades de muestra para la vigilancia sanitaria de alimentos preparados**, el cual indica que, para el caso de la vigilancia sanitaria de alimentos y bebidas preparados provenientes de establecimientos de comercialización, preparación y expendio, se toma una muestra por cada establecimiento ($n=1$) y debe ser calificado con los límites más exigentes (m).

Según información obtenida del área de rentas del municipio de Abancay (anexo 1), el centro poblado Las Américas cuenta con 8 locales de pollerías, sin embargo, al realizarse la verificación in situ se evidenció que algunos locales ya no laboraban, también se encontró locales que no se encontraban en la lista, o que estaban registrados como restaurante, sumando en general 16 locales de pollerías y, según lo dispuesto anteriormente, se tomó 1 muestra por cada establecimiento, siendo en total 16 muestras. El tamaño de la unidad de muestreo fue de 200g.

3.6. Procedimiento de la investigación

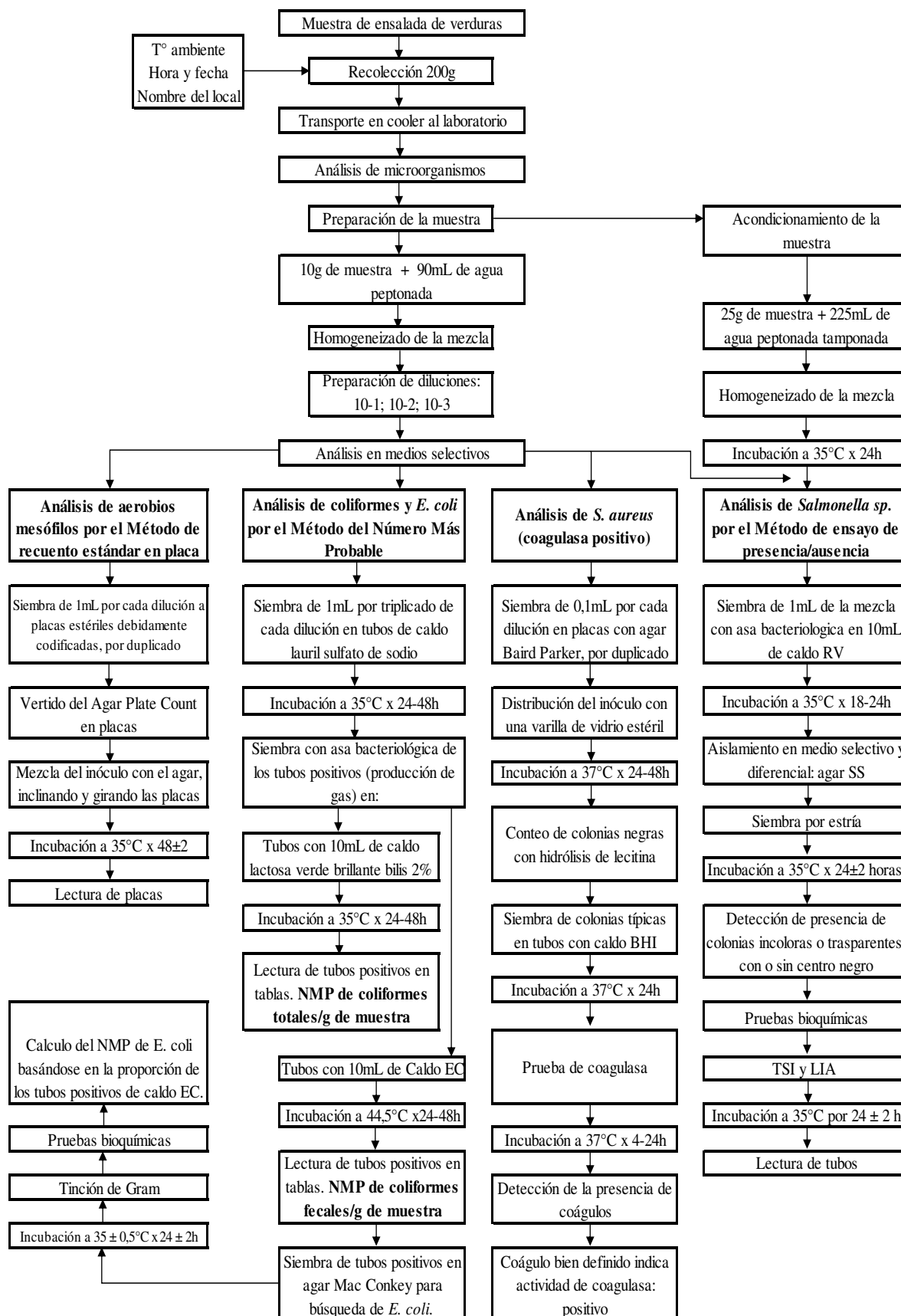


Diagrama 1. Diagrama del procedimiento de la investigación.

3.6.1. Procedimiento de la toma de muestra

La toma de muestra se realizó siguiendo el procedimiento establecido en el Manual de Análisis Microbiológico de Alimentos (22), de la siguiente manera:

La cantidad de muestra fue de 200g y se recolectó en las mismas condiciones de venta en el local de pollería, en envases estériles debidamente codificadas, estas se acondicionaron en cajas refrigerantes con paquetes de hielo (gelpack) para luego ser transportadas inmediatamente al laboratorio. Se consideró los siguientes datos por cada muestra: temperatura aproximada a la que se ha mantenido, nombre y dirección de la pollería, ingredientes de las ensaladas. (36) Estos datos se muestran en la tabla 4. La hora de atención de las pollerías inicia entre las 16:00 y 17:00 horas, la hora de muestreo fue entre las 18:00 y 20:00 horas.

Tabla 4. *Pollerías del centro poblado Las Américas*

Número de local	Ingredientes de la muestra de ensalada*		Nombre de local	Dirección
	Crudos	Cocidos		
1	Lechuga, col, pepino, tomate	Betarraga, zanahoria, coliflor	Leña & Piedra	Av. Venezuela S/N
2	Lechuga, col	Betarraga, zanahoria	Palacio Del Pollo	Av. Venezuela S/N
3	Col, pepino, tomate	Betarraga, zanahoria, coliflor	Pura Leña Asia	Av. Venezuela S/N
4	Tomate, col, pepino	Betarraga	La Leña Las Américas	Av. Venezuela S/N
5	Lechuga, col, pepino, tomate	Betarraga, zanahoria	Súper Carboleña I	Av. Venezuela S/N
6	Col, pepino, tomate	Betarraga, zanahoria, coliflor	Pollo Loco	Av. Venezuela S/N
7	Lechuga, col, pepino, tomate	Betarraga, zanahoria, coliflor, brócoli	El Gato	Av. Panamá 101
8	Lechuga, col, pepino	Coliflor, arvejas	El Buen Sabor	Av. Venezuela S/N
9	Lechuga, col, pepino, tomate	Betarraga	D' Todos	Av. Fonavi S/N
10	Lechuga, col, pepino, tomate	Betarraga, zanahoria	Súper Carboleña II	Av. Seoane 103
11	Lechuga, col, pepino, tomate	Betarraga, zanahoria, coliflor	The Rocoroco	Av. Las Malvinas S/N
12	Lechuga, col, pepino, tomate	Zanahoria	Sabor Limeño	Av. Las Malvinas S/N
13	Lechuga, col, pepino, tomate	Betarraga, zanahoria	A La Leña Altipuerto	Av. Circunvalación S/N
14	Lechuga, tomate, pepino	Betarraga, zanahoria, coliflor	Pollería Ismael	Av. Venezuela S/N
15	Lechuga, col, pepino	Betarraga, zanahoria, coliflor	Pollería Alin	Av. Las Malvinas 309
16	Lechuga, col, pepino	Betarraga, zanahoria, coliflor, brócoli	Pollería Nayely	Av. Las Malvinas 311

*Temperatura promedio: 18°C; temperatura del cooler: 8°C

3.6.2. Procedimiento del análisis microbiológico de las muestras

El análisis microbiológico se realizó de acuerdo a la metodología establecida por la DIGESA (22), con estos resultados se verificó si se encuentran dentro de los parámetros de la Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano.

3.6.2.1. Numeración de microorganismos aerobios mesófilos por el método de recuento estándar en placa.

Día 1: Se pesó 10g de muestra y se añadió 90mL de agua peptonada al 0,1%, se homogenizó por 30 segundos. Se sembró tres diluciones distintas: 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Para ello se pipeteó 1mL de cada dilución a placas estériles debidamente codificadas. Se vertió en la placa el agar fundido y temperado a 44-46°C. Seguidamente, se mezcló el inóculo con el medio fundido, inclinándolo y girando las placas. Una vez solidificado el agar, se invirtió las placas y se incubó a 35°C durante 48±2 horas.

Día 3: Se calculó el recuento estándar en placa estimado.

3.6.2.2. Numeración de coliformes y *Escherichia coli* por el método del número más probable

Se pesó 10g de muestra y se añadió 90mL de agua peptonada al 0,1%, se homogenizó por 30 segundos. Se sembró tres diluciones distintas: 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .

Prueba presuntiva:

- Se añadió 1mL de la dilución 10^{-1} g/mL a cada uno de 3 tubos con 10 mL de caldo lauril sulfato de sodio.
- Se añadió 1mL de las diluciones 10^{-2} g/mL y 10^{-3} g/mL a dos series de 3 tubos cada una con caldo lauril sulfato de sodio.
- Se incubó a 35-37°C durante 24-48 h.
- Los tubos después de la incubación, se registraron como positivos por presentar crecimiento y producción de gas.

Prueba confirmativa de microorganismos coliformes totales:

- Se transfirió de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo obtenido durante la prueba presuntiva a otro tubo de 16 x 125mm que contenía caldo de bilis verde brillante (brilla), con campana de Durham invertido.
- Se agitó los tubos para su homogeneización.
- Se incubó a 35 ± 2°C durante 24 a 48 h.

- Se registraron como positivos aquellos tubos en donde se observó crecimiento y producción de gas, después de un período de incubación de 24 a 48 h.
- Se consultó las tablas de NMP.

Prueba confirmativa de microorganismos coliformes fecales:

- Se transfirió de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo obtenido durante la prueba presuntiva (caldo lauril sulfato de sodio) a un tubo de 16 x 125mm, con caldo EC conteniendo campana de Durham invertidos.
- Se agitó los tubos para su homogeneización.
- Se incubó a $44,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ durante 24h a 48h.
- Se registró como positivos todos los tubos en donde se observó turbidez y producción de gas después del período de incubación.
- Se consultó la tabla de NMP.

Prueba confirmativa de *Escherichia coli*:

- Se confirmó la presencia de *Escherichia coli* en por lo menos el 10% de las pruebas con resultados positivos de coliformes fecales; se sembró en placas de agar MacConkey a partir de los tubos que demostraron la presencia de gas en la prueba confirmativa.
- Se incubó las placas a $35^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 h, se observó las colonias típicas fermentadoras de color rojo rodeadas de un halo opaco de precipitación de sales biliares.
- Se hizo tinción de Gram para la observación de morfología de las bacterias.
- Se calculó el NMP de *E. coli* basándose en la proporción de los tubos positivos de caldo EC.

Se continuó con las pruebas bioquímicas:

- Producción de Indol:** se inoculó un tubo de caldo triptona y se incubó por 24 ± 2 horas a 35°C . Se detectó la presencia de Indol, añadiendo 0,2-0,3 mL del reactivo de Kovacs. La aparición de un color rojo distintivo en la capa superior, indicó que es positivo.
- Citrato:** se inoculó ligeramente un tubo de agar Citrato de Simmons; impidiendo turbidez detectable. Se incubó 24 ± 2 horas a 35°C , un cambio de color a medio azul es positivo.

Cálculos y expresión de resultados: Se calculó la densidad microbiana con base al número más probable conforme a lo señalado en la tabla NMP (Anexo 4).

3.6.2.3. Numeración de *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo)

Para el recuento de *Staphylococcus aureus* (estafilococos coagulasa positivos) se utilizó como medio de cultivo Agar Baird Parker que es un medio selectivo para esta especie bacteriana y el método de recuento en placa.

Día 1: Se pesó 10 g de muestra y se agregó 90 mL de agua peptonada al 0,1%. Se procedió a preparar las diluciones. Se transfirió 0,1mL del homogenizado y de sus diluciones a la superficie del medio agar Baird Parker en placas y se extendió el inóculo con ayuda de las varillas de vidrio hasta que sea absorbido por el medio. Se incubó las placas en posición invertida a 35°C-37°C durante 30 a 48 horas.

Día 3: Se eligió las placas que contenían entre 20 y 200 colonias aisladas y se contó todas las colonias negras y brillantes de margen estrecho y blanco rodeadas de áreas claras que se extendían en el medio opaco. Así mismo se contó también aquellas colonias cuyo color era negro brillante con o sin margen estrecho blanco y que no presentaban el área de aclaramiento. Seguidamente se picó no menos de 5 colonias sospechosas de ser *S. aureus* a agar Tryticasa Soya (TSA) para posteriormente llevar a cabo la prueba de la coagulasa.

Prueba de la coagulasa: Del agar TSA se sembró a caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI), las presuntas colonias sospechosas de *S. aureus* y se incubó durante 20 – 24 horas a 35-37°C. Se pasó 0,1mL de los cultivos de agar TSA a los tubos conteniendo 0,3 mL de plasma de conejo oxalato y se incubó a 35-37°C. Se examinó los tubos a las 4 horas con el fin de detectar la presencia de coágulos, si no se observaron, se mantuvo los tubos a temperatura ambiente y se volvió a leer a las 24 horas. La aparición de un coágulo bien definido indicó actividad de coagulasa.

3.6.2.4. Investigación de *Salmonella sp.* por el método de ensayo de presencia/ausencia

Día 1: Preparación de alimentos para el aislamiento de *Salmonella sp.*, El método se basó en el análisis de una unidad analítica de 25g en una relación de muestra/caldo de 1:9. Se pesó asépticamente una muestra de 25g y se homogenizó en 225mL de agua peptonada tamponada. Se transfirió asépticamente la muestra a un frasco de 500mL boca ancha y con tapa rosca estéril dejándolo reposar 60 minutos a temperatura ambiente con la tapa bien ajustada. Se mezcló bien moviendo el frasco, se aflojó la tapa del frasco y se incubó a 24 ± 2 horas a 35°C.

Día 2: Aislamiento de *Salmonella sp.*, Se ajustó la tapa del frasco y se agitó suavemente la mezcla de muestra incubada, se transfirió 1mL de la mezcla a 10mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV). Se incubó por 18- 24h a 35°C.

Día 3: Se mezcló y se sembró por agotamiento y estría o asa de 3 mm de caldo RV en medio de aislamiento selectivo agar *Salmonella-Shigella* (SS). Se incubó las placas 24±2 horas a 35°C. Se examinó las placas para detectar la presencia de colonias que se sospeche con *Salmonella*, colonias incoloras o transparentes, con o sin centro negro. Se seleccionó dos o más colonias típicas (o sospechosas) de *Salmonella* del agar selectivo. Se inoculó en Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), Agar Lisina Hierro (LIA). Se tocó suavemente el centro de la colonia que se escogió con una aguja de inoculación estéril, y se inoculó el TSI sembrando en estrías cultivo inclinado y picando la columna del medio. Sin flamear se inoculó Agar LIA picando la columna del medio tres veces y luego sembrando en estrías cultivo inclinado. Se incubó a 35°C por 24 ± 2 horas. Se taparon los tubos.

Día 4: Generalmente, *Salmonella* en cultivo de agar TSI produce típicamente en la parte inclinada una reacción alcalina (roja) y en la columna del medio una reacción ácida (amarilla), con o sin producción de ácido sulfhídrico (H₂S) (oscurecimiento del agar). En el caso del agar LIA, la *Salmonella* produce típicamente una reacción alcalina (púrpura) en la columna del medio del tubo. Se considera una reacción ácida (negativa) solo cuando la columna presente un color amarillo distintivo. La mayoría de cultivos de *Salmonella* producen H, S en agar LIA. Algunos cultivos que no son producen una reacción rojo-ladrillo en el agar LIA.

3.7. Material de la investigación

3.7.1. Material de vidrio

- Placas Petri de vidrio 100x15 mm
- Pipetas bacteriológicas 5, 10 mL
- Probetas de 250 mL.
- Botellas para dilución de 250, 500 y 1000 mL de vidrio con tapa rosca, BOECO
- Tubos de ensayo con tapa 16x125mm, 16x150mm.
- Espátulas de Drigalski.

3.7.2. Insumos

- Peptona bacteriológica HIMEDIA
- Agua destilada estéril
- Agar Plate Count (APC) BIOCEN
- Caldo Lauril Sulfato de Sodio MICROGEN
- Caldo EC HIMEDIA
- Caldo Lactosa Verde Brillante Bilis 2% (Caldo Brilla) HIMEDIA
- Agar MacConkey HIMEDIA

- Agar Baird Parker BD Difco™
- Emulsión yema de huevo con telurito HIMEDIA
- Agar Trypticase Soya BD Difco™
- Caldo BHI MERCK
- Plasma de conejo con EDTA
- Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV)
- Agar SS MERCK
- Agar Citrato de Simmons MERCK
- Agar Lisina Hierro (LIA) MERCK
- Agar Hierro Tres Azúcares (TSI) MERCK

3.7.3. Reactivos

- Kit de colorantes para tinción Gram BIODISC SAC.
- Reactivo de Kovacs (Indol) BIODISC SAC.

3.7.4. Equipos

- Balanza eléctrica cap. 200g Serie DP-22083
- Estufa para esterilización MEMMERT modelo 100-800
- Incubadora MEMMERT.
- Baño María temperada a 45 °C SELECTA
- Autoclave cap. 30L ALL AMERICAN
- Mechero Bunsen
- Refrigeradora COLDEX
- Cooler con bolsas gel pack.
- Pipetor automático de volumen graduable (100-1000 µL) ISOLAB.

3.7.5. Otros

- | | |
|---------------------------|--|
| - Algodón | - Jabón líquido |
| - Papel craft | - Paños |
| - Papel aluminio | - Papel toalla |
| - Pabilo | - Detergente |
| - Alcohol etílico 96°, 3L | - Lejía |
| - Guantes descartables | - Utensilios estériles para manejar las muestras (bolsas plásticas 20x15cm, cucharas, cuchillos, tenedores, pinzas, tijeras, espátulas). |
| - Plumón indeleble | |
| - Engrapador | |
| - Grapas | |

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Descripción de los resultados

El análisis de los resultados se determinó a partir de las 16 muestras de ensaladas mixtas procedentes de cada uno de los locales de pollerías del centro poblado Las Américas. Los promedios generales obtenidos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultado microbiológico promedio del análisis microbiológico de ensaladas de pollerías.

Indicador microbiológico	Resultado promedio	Desviación estándar
Aerobios mesófilos	12×10^4 UFC/g	$\pm 21 \times 10^4$ UFC/g
Coliformes	32×10^2 NMP/g	$\pm 33 \times 10^2$ NMP/g
<i>Escherichia coli</i>	16×10 NMP/g	$\pm 7 \times 10$ NMP/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	17×10^2 UFC/g	$\pm 17 \times 10^2$ UFC/g
<i>Salmonella sp.</i>	Ausencia	-

En la figura 1, se muestran los porcentajes obtenidos de los análisis microbiológicos de las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, calificándolos como ACEPTABLES y NO ACEPTABLES.

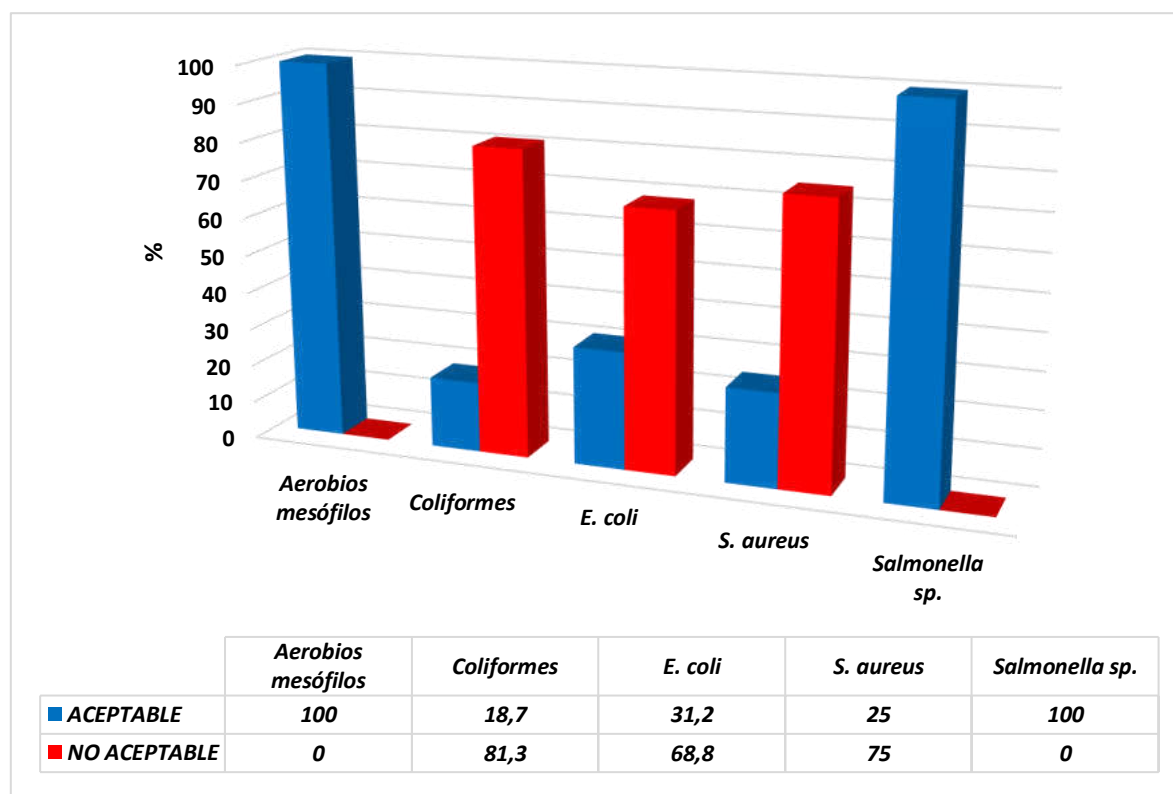


Figura 1. Resultados microbiológicos por tipo de indicador microbiológico evaluado, expresado en porcentaje.

4.1.1. Recuento de aerobios mesófilos

El recuento se realizó según el procedimiento normalizado de operación para la numeración de microorganismos aerobios mesófilos (Anexo 1), en la tabla 6 se observa que se obtuvieron aerobios mesófilos en los 16 locales de pollerías, de los cuales los locales 1, 2, 3 y 15, obtuvieron los recuentos más altos, se rescatan los locales 7 y 8 donde se detectaron los niveles más bajos, 86×10^2 UFC/g y 8×10^3 UFC/g respectivamente, los resultados en su totalidad cumplen con la NTS N°071-MINSA/DIGESA (límite máximo permisible 10^5 UFC/g de aerobios mesófilos). En la figura 2 se visualiza los resultados en un diagrama de barras.

Tabla 6. Resultados promedio del recuento en placa para aerobios mesófilos en muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en UFC/g

Número de muestra	Recuento estándar en placa para aerobios mesófilos (UFC/g)	Calificación Aceptable/ No aceptable
1	13×10^4	Aceptable
2	13×10^4	Aceptable
3	12×10^4	Aceptable
4	76×10^3	Aceptable
5	91×10^3	Aceptable
6	58×10^3	Aceptable
7	86×10^2	Aceptable
8	8×10^3	Aceptable
9	13×10^3	Aceptable
10	39×10^3	Aceptable
11	26×10^3	Aceptable
12	79×10^3	Aceptable
13	54×10^3	Aceptable
14	88×10^3	Aceptable
15	13×10^4	Aceptable
16	93×10^3	Aceptable

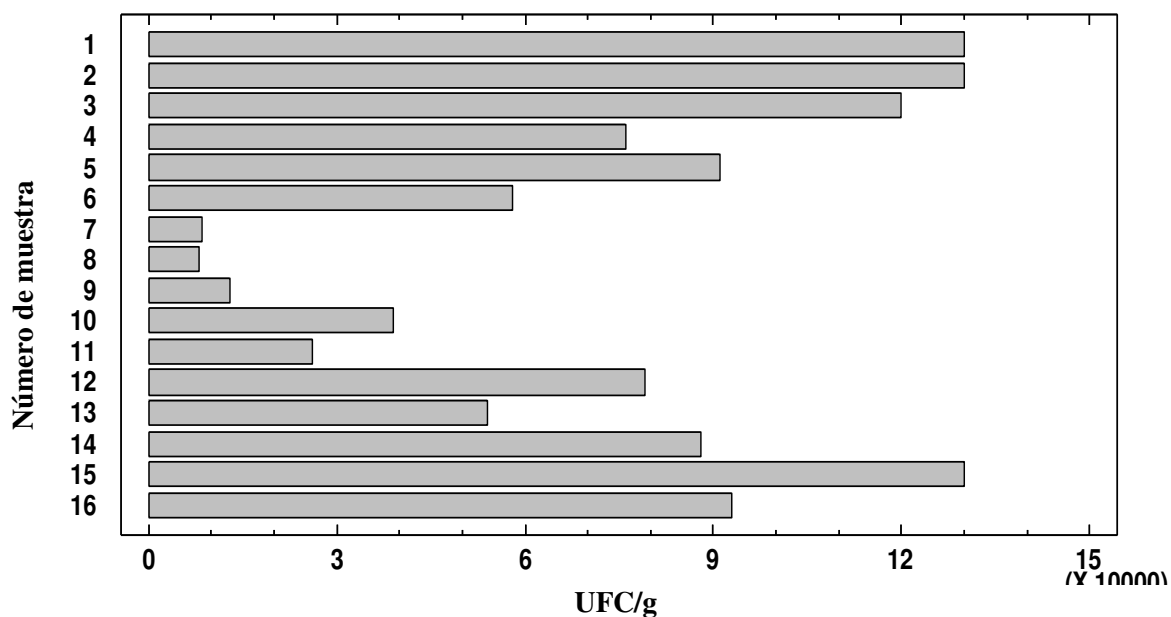


Figura 2. Diagrama de barras de los resultados de aerobios mesófilos en las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en UFC/g.

El 100% (16/16) de las muestras analizadas se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la NTS.

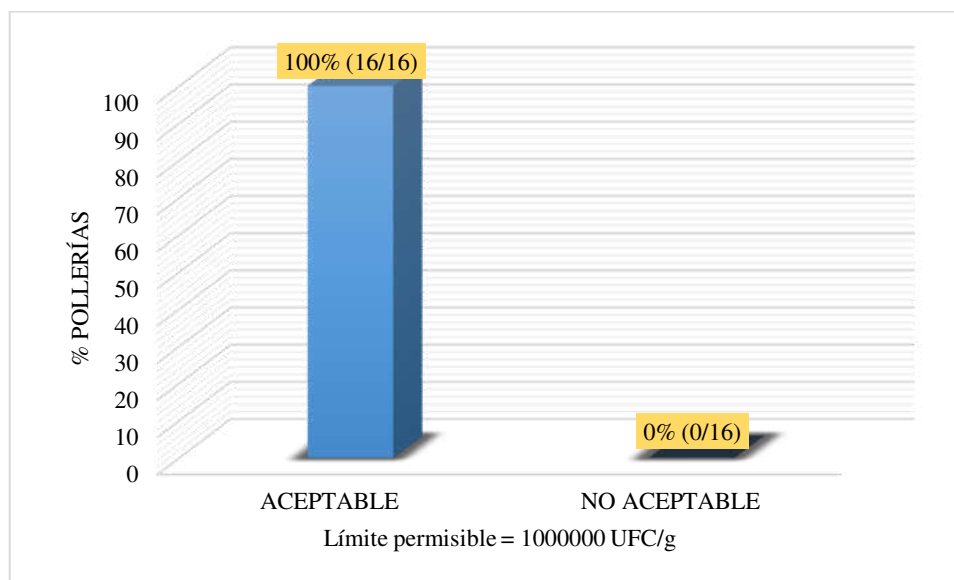


Figura 3. Detección de aerobios mesófilos, expresados en porcentaje.

4.1.2. Recuento de coliformes

Los resultados del análisis de coliformes se basaron en el método NMP (número más probable en tubos múltiples), las 16 muestras analizadas, que se muestran en la tabla 7, indican que solo 3 locales (2, 3 y 11), cumplen con la NTS N°071-MINSA/DIGESA (límite máximo permisible 10^2 UFC/g).

Tabla 7. Resultados de coliformes de las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en NMP/g.

Número de muestra	Coliformes NMP/g	Calificación Aceptable/ No aceptable
1	46 x10	No aceptable
2	8 x10	Aceptable
3	8 x10	Aceptable
4	15 x10	No aceptable
5	46 x10	No aceptable
6	29 x10	No aceptable
7	15 x10	No aceptable
8	12 x10	No aceptable
9	21 x10	No aceptable
10	29 x10	No aceptable
11	1 x10	Aceptable
12	21 x10	No aceptable
13	11 x10	No aceptable
14	21 x10	No aceptable
15	29 x10	No aceptable
16	11 x10	No aceptable

La figura 4 muestra que los locales 1 y 5 representan los recuentos más altos en coliformes, en ambos se obtuvo el resultado de 46 x10 NMP/g, el local 11, por el contrario, obtuvo el valor más bajo, 1 x10 NMP/g, y junto a los locales 2 y 3, cuyo resultado para ambos casos es 8 x10 NMP/g, son los únicos que se encuentran dentro de los parámetros establecidos.

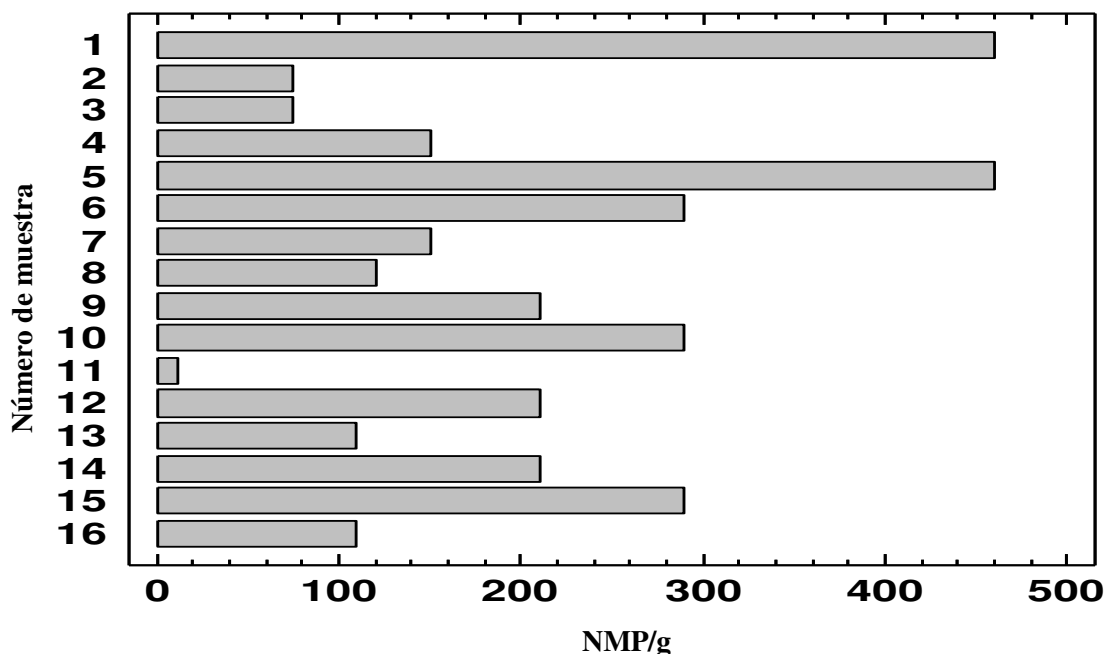


Figura 4. Diagrama de barras de los resultados de coliformes de las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en NMP/g.

El 18,7% (3/16) de los resultados obtenidos califica como dentro de los parámetros establecidos, y el 81,3% (13/16) fuera de los parámetros.

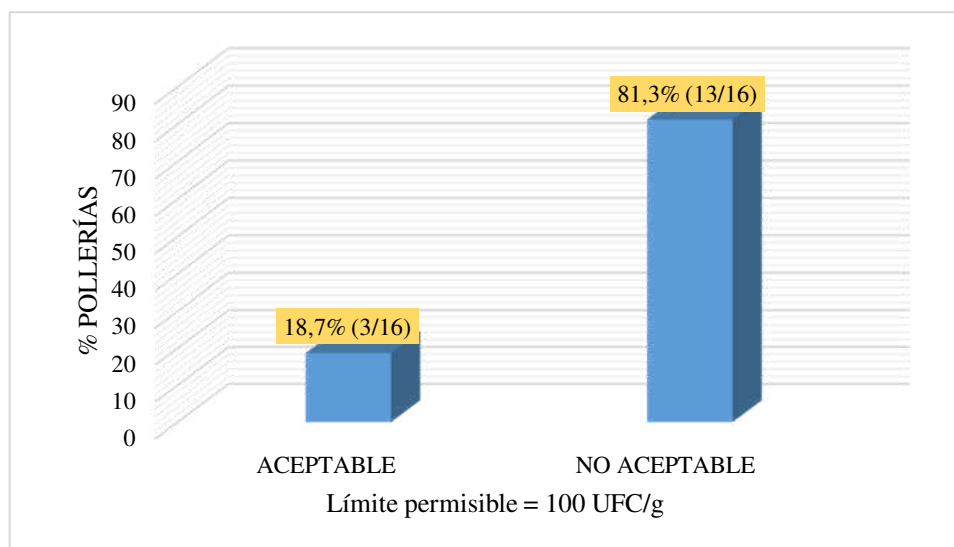


Figura 5. Detección de coliformes, expresados en porcentaje.

4.1.3. Recuento de *Escherichia coli*

La tabla 8 presenta los resultados de las muestras positivas para *E. coli* en cada uno de los locales de pollerías. Las muestras 1, 2, 3, 8 y 11, son las muestras dentro de los parámetros establecidos, que indica que el límite máximo es 10 NMP/g (NTS N°071-MINSA/DIGESA), en cambio, las muestras restantes, que representan el 68,75% (11/16) están fuera del límite permitido, estos resultados confirman la evidente contaminación de origen fecal por la falta de higiene durante el periodo de elaboración o manipulación del producto. Resultados que también se observan en la figura 6.

Tabla 8. Resultado de *E. coli* de las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en NMP/g.

Número de muestra	<i>E. coli</i> (NMP/g)	Calificación Aceptable / No aceptable
1	7	Aceptable
2	7	Aceptable
3	7	Aceptable
4	2 x10	No aceptable
5	2 x10	No aceptable
6	2 x10	No aceptable
7	1.5 x10	No aceptable
8	7	Aceptable
9	2 x10	No aceptable
10	1.5 x10	No aceptable
11	7	Aceptable
12	2 x10	No aceptable
13	2 x10	No aceptable
14	3 x10	No aceptable
15	2 x10	No aceptable
16	3 x10	No aceptable

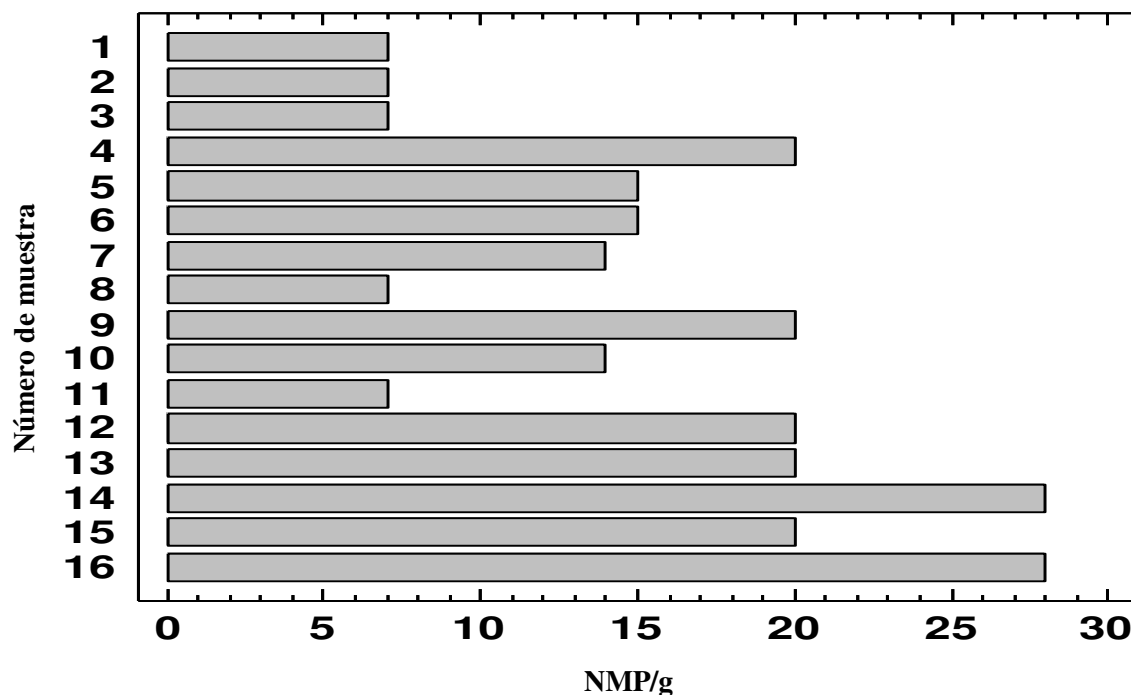


Figura 6. Gráfico de barras de los resultados de *E. coli* de las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en NMP/g.

Solo 5 locales obtuvieron resultados dentro del parámetro establecido, es decir el 31,2% (5/16) califica dentro de los parámetros, los locales 14 y 16 por el contrario, obtuvieron los resultados más altos, 3 x10 NMP/g para ambos casos, en total, los locales que no cumplen con los parámetros representan el 68.8%.

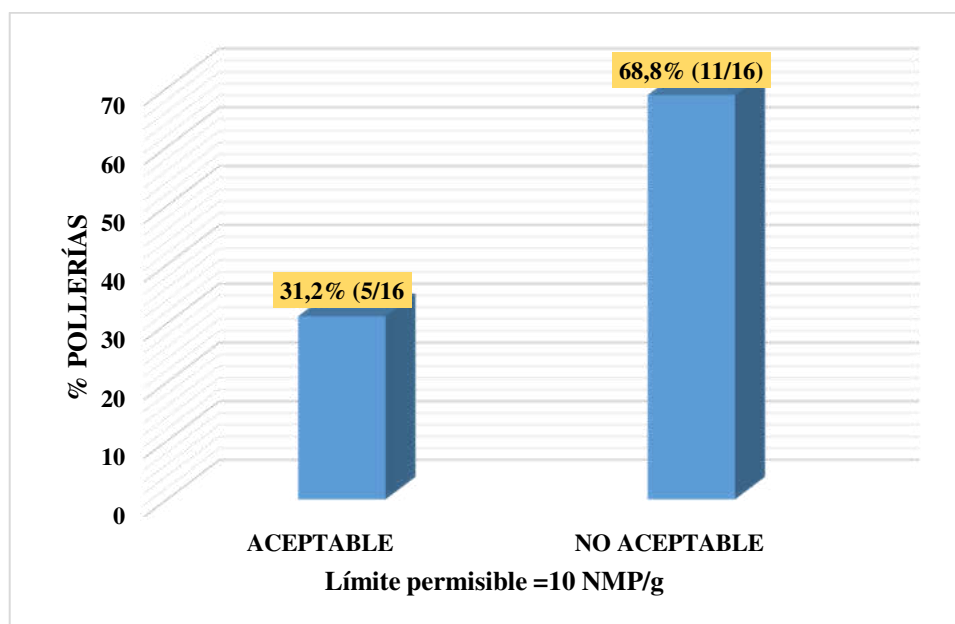


Figura 7. Detección de *E. coli*, expresados en porcentaje.

4.1.4. Recuento de *Staphylococcus aureus*

El análisis microbiológico de *S. aureus* coagulasa positivo, se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el Manual de microbiología (Anexo 5). Se encontró *S. aureus* en 12 de las 16 muestras analizadas (tabla 9), esto representa al 75% (12/16) del total fuera de los parámetros establecidos por la NTS N°071-MINSA/DIGESA, que indica que el límite máximo permitido es de 10 UFC/g. La figura 8 muestra gráficamente las diferencias entre las muestras, 4 de las 16 muestras se encuentran dentro de los límites, los locales 6 y 13 muestran los recuentos más altos de *S. aureus*, 52×10^2 UFC/g y 55×10^2 UFC/g respectivamente.

Tabla 9. Resultados del recuento de *S. aureus* de las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en UFC/g.

Número de muestra	<i>S. aureus</i> (UFC/g)	Calificación Aceptable /No aceptable
1	21×10^2	No aceptable
2	18×10^2	No aceptable
3	21×10^2	No aceptable
4	19×10^2	No aceptable
5	<10	Aceptable
6	52×10^2	No aceptable
7	<10	Aceptable
8	<10	Aceptable
9	<10	Aceptable
10	13×10	No aceptable
11	67×10	No aceptable
12	76×10	No aceptable
13	55×10^2	No aceptable
14	24×10^2	No aceptable
15	26×10^2	No aceptable
16	21×10^2	No aceptable

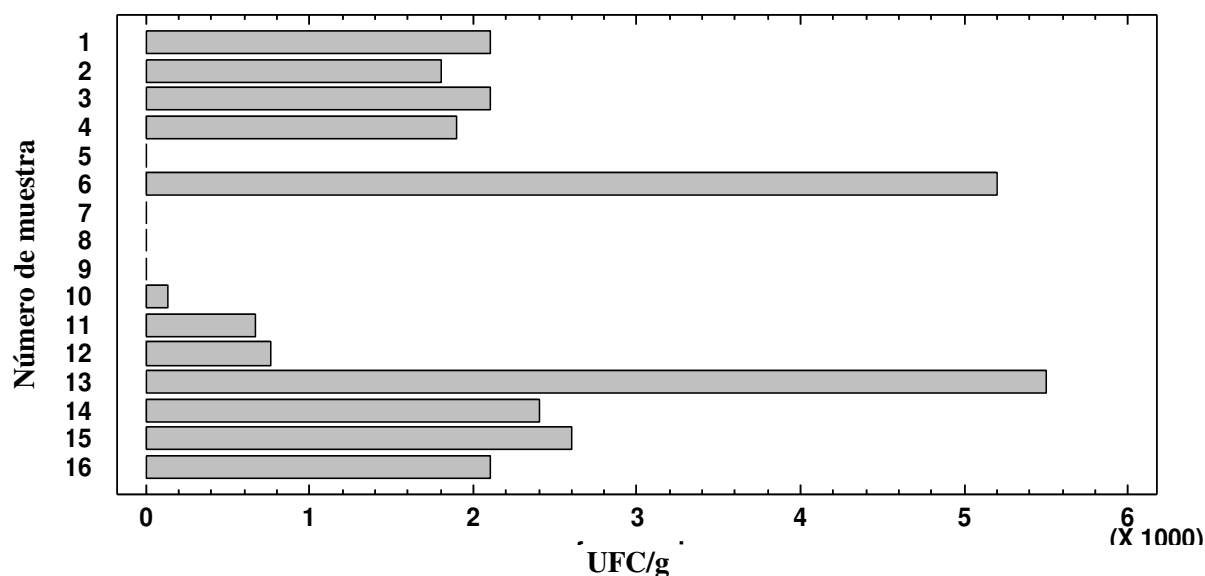


Figura 8. Gráfico de barras de los resultados del recuento de *S. aureus* en las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en UFC/g.

El 75% (12/16) de las muestras analizadas no cumplen con los parámetros establecidos por las NTS.

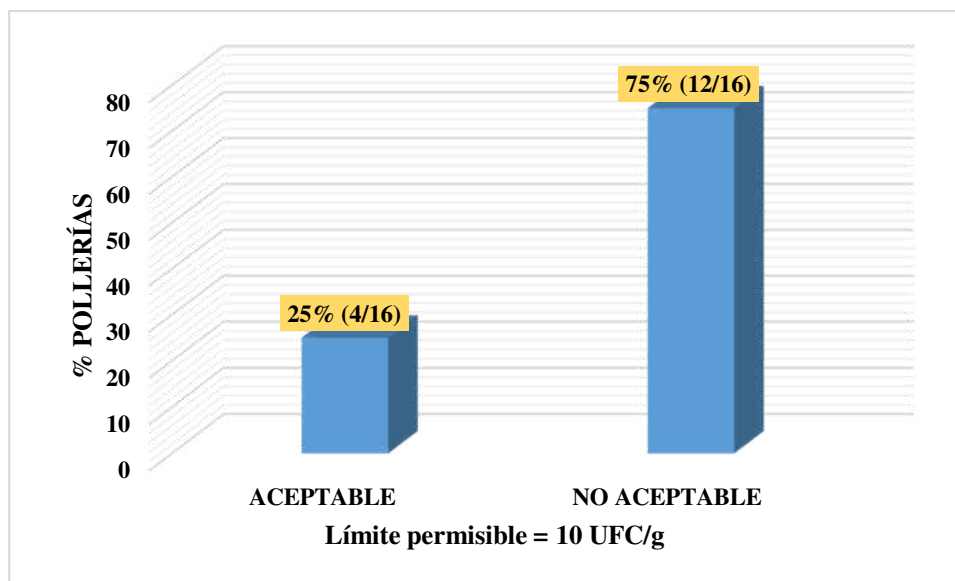


Figura 9. Detección de *S. aureus*, expresados en porcentaje.

4.1.5. Investigación de *Salmonella sp.*

Para el análisis microbiológico de *Salmonella sp.* se siguió el procedimiento descrito en el Manual de microbiología, método de ensayo Presencia/Ausencia, los resultados obtenidos se detallan en la tabla 10.

Tabla 10. Resultado de detección de *Salmonella sp.* en las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas

Numero de muestras	Resultado	Calificación Aceptable/ No aceptable
1	Ausencia/25g	Aceptable
2	Ausencia/25g	Aceptable
3	Ausencia/25g	Aceptable
4	Ausencia/25g	Aceptable
5	Ausencia/25g	Aceptable
6	Ausencia/25g	Aceptable
7	Ausencia/25g	Aceptable
8	Ausencia/25g	Aceptable
9	Ausencia/25g	Aceptable
10	Ausencia/25g	Aceptable
11	Ausencia/25g	Aceptable
12	Ausencia/25g	Aceptable
13	Ausencia/25g	Aceptable
14	Ausencia/25g	Aceptable
15	Ausencia/25g	Aceptable
16	Ausencia/25g	Aceptable

El 100% (16/16) de los locales de pollerías no reporta presencia de *Salmonella sp.* lo cual es favorable, ya que cumple con lo establecido por la NTS N°071-MINSA/DIGESA, ausencia/25g.

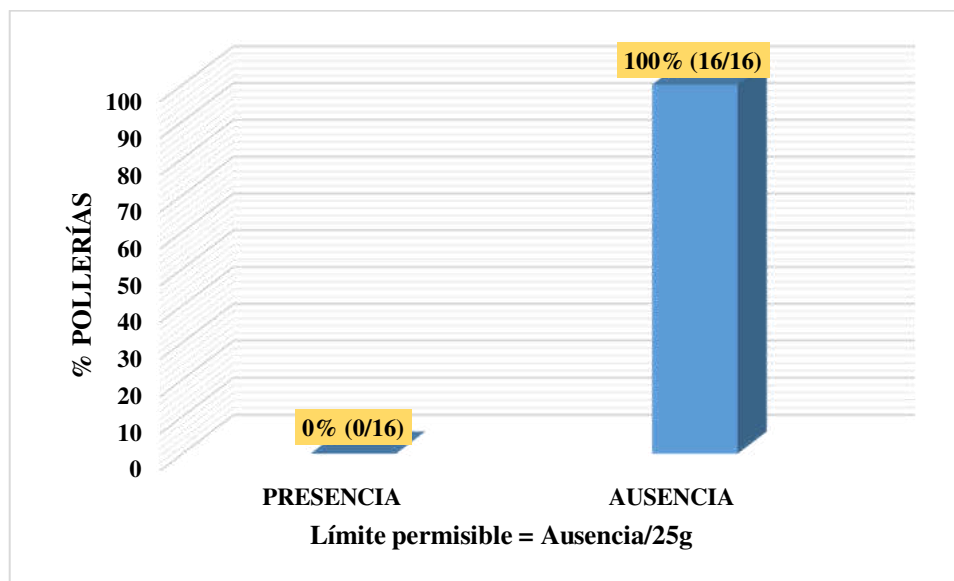


Figura 10. Detección de *Salmonella sp.*, expresados en porcentaje.

4.2. Discusión de resultados

- Los resultados obtenidos en la presente investigación, permiten evidenciar la calidad microbiológica de las ensaladas de pollerías, afectados por la contaminación microbiana y la caracterización de ellos. Puesto que estas, pueden contaminarse de manera natural con polvo y tierra durante el proceso de cosecha, manejo y almacenamiento de los vegetales y con microorganismos patógenos por manos de manipuladores, presencia de insectos o roedores; por operaciones de lavado, riego o tratamientos superficiales con agua natural o residual. Cualquier tipo de contaminante representa un serio riesgo para la salud, que puede ir desde el desarrollo de enfermedades leves hasta serios problemas infecciosos o tóxicos que pueden causar la muerte sobre todo en grupos vulnerables. Cabe resaltar que, el proceso de preparación de ensaladas es bastante susceptible de contaminarse con microorganismos patógenos, pues, generalmente no se realiza ningún tratamiento adicional al lavado que asegure la eliminación eficaz de los microorganismos y, si a esto le sumamos las malas prácticas de manipulación; esto representaría, como ya se mencionó, un peligro para la salud (38).
- En el análisis de microorganismos aerobios mesófilos, se estima la flora total, pero sin especificar tipos de gérmenes (39), en las 16 muestras analizadas, el 100% (16/16) cumple con los parámetros establecidos por la NTS (límite máximo 10^5 UFC/g), valores aceptables a diferencia de otras investigaciones, cuyo recuento total (100%) se encontraron por encima de lo establecido (40) y en otra investigación el 15.66% cumple y el 84.34% de las muestras no

cumplen con las normas (41), estos índices tienen un valor limitado como indicador de la presencia de patógenos o sus toxinas, reflejando la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además las condiciones higiénicas de la materia prima y la forma como fueron manipulados durante su elaboración (39), así como materia prima excesivamente contaminada, deficientes métodos de manipulación durante la elaboración de los productos. Por tratarse de microorganismos mesófilos, cabe la posibilidad que entre ellos pueda haber microorganismos patógenos, dado que esta flora suele ser mesófila, altos recuentos suelen ser signo de inmediata alteración del producto (42). Un recuento total de aerobios mesófilos bajo no asegura que un alimento este exento de patógenos o sus toxinas; tampoco un recuento total alto significa, inevitablemente, presencia de flora patógena. Todos los utensilios de cocina antes de ser empleados en la preparación de alimentos deben desincrustarse, lavarse y posteriormente desinfectarse con yodo, cloro, mediante inmersión de agua caliente a una temperatura de 75° a 82 °C por lo menos durante medio minuto, cada vez que se utilicen con alimentos diferentes. Las tablas y utensilios cortantes tales como: cuchillos, cucharas, cucharones y pinzas, que se empleen para efectuar la manipulación de alimentos, deben ser diferentes para los crudos y para los cocidos (42).

- Para el estudio de microorganismos indicadores de higiene, se analizó la presencia de coliformes, evidenciándose que, solo 3 locales cumplen con la NTS N°071-MINSA/DIGESA (límite máximo permisible 10^2 UFC/g), este resultado representa al 81,3% (13/16) fuera del límite establecido, resultados similares se obtuvo en otras investigaciones, donde el 95,18% de las pollerías analizadas superó el límite permisible (41), y en otro estudio la prueba de coliformes totales realizadas a cada muestra de ensalada fue positiva para todas, 100% (40). La presencia de los coliformes en los alimentos indica deficientes prácticas de sanitización de superficies inertes y un mal proceso de desinfección de verduras (42). Por otro lado, los coliformes se reproducen con facilidad sobre las superficies sucias por contacto con los alimentos, sin necesidad de nutrientes usuales. Los coliformes se destruyen fácilmente mediante procedimiento de desinfección higiénica, soluciones desinfectantes y/o exposición a un calor moderado, un número elevado de coliformes puede ser el resultado de condiciones higiénicas deficientes de las instalaciones, de contaminación poselaboración o de ambas. (1) Por otro lado, se considera a los coliformes como un excelente indicador de la eficiencia de los procesos de sanitización y desinfección, así como de calidad sanitaria en agua, vegetales y diversos productos procesados (43). Existen evidencias que demuestran que el uso de agua de riego contaminada puede incrementar la frecuencia de microorganismos patógenos detectados en productos cosechados, el estiércol y los desechos biológicos sólidos son un fertilizante inocuo y efectivo si se tratan debidamente, pero constituyen una fuente de microorganismos patógenos que pueden contaminar las frutas y hortalizas, y constituir una importante amenaza para la salud humana, si no se tratan previamente o el tratamiento no es el adecuado y se usan como abono o

para mejorar la composición del suelo (38). Los utensilios y recipientes que se empleen para servir porciones de alimentos, deben lavarse por lo menos cada cuatro horas o cuando se vayan a emplear en diferentes alimentos (42). Este punto no se cumple en estos locales de pollerías, pues se observó que la pinza con la que se sirve las ensaladas, se lava una sola vez durante toda la jornada de atención.

- Respecto al análisis microbiológico de *E. coli*, un organismo de origen totalmente intestinal, a diferencia de los coliformes totales (39), 5 de las 16 muestras, cuyos resultados fueron 7 NMP/g, calificaron dentro del parámetro establecido (límite máximo 10 NMP/g), en cambio, las muestras restantes, que representan el 68,8% (11/16) están fuera del límite permitido, esto indica una deficiente higiene personal principalmente, y mala o nula práctica del lavado de manos (42). A diferencia de otras investigaciones, que obtuvieron recuentos bajos, en el caso de ensaladas que se expenden en las principales pollerías de Huánuco, se obtuvo resultados de presencia de *E. coli* en un 45,0% (11), en otro estudio se obtuvieron muestras positivas de 24,10% (20). Gran parte de los establecimientos inspeccionados preparan las ensaladas sin ningún tratamiento adicional al lavado o realizan el proceso de desinfección de manera incorrecta, sin tomar en cuenta que la contaminación se da desde la materia prima, debido al agua de riego, asimismo los abonos no tratados adecuadamente pueden ser una fuente potencial de patógenos de transmisión alimentaria, los abonos de origen animal que pueden contener patógenos entéricos como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella sp.*, que en el caso de no eliminarse, pueden persistir hasta 3 meses en los suelos abonados, los recolectores y los manipuladores, que pueden ser vectores de intoxicaciones alimentarias en el caso de ser portadores de patógenos y tener una higiene personal deficiente (3), razón por la cual, es necesario una eficiente desinfección de las verduras, así como un óptimo tratamiento térmico, si es el caso.
- Como microorganismos patógenos se analizó *S. aureus* coagulasa positivo, su presencia en número reducido puede indicar prácticas antihigiénicas de los manipuladores de alimentos, particularmente en lo que se refiere al aseo de las manos. Este microorganismo puede destruirse fácilmente mediante calor, por lo que su presencia después del tratamiento térmico es indicativo de la posibilidad de que se haya producido contacto con seres humanos o animales (1). En los análisis realizados, se encontró *S. aureus* en 12 de las 16 muestras, esto representa al 75% (12/16) fuera de los parámetros establecidos (límite máximo 10 UFC/g), recuentos más bajos se obtuvieron en otras investigaciones, 21,69% para el caso de ensaladas analizadas en pollerías de la región de Huánuco (41). Este microorganismo se encuentra en la piel y mucosas de la mayoría de los seres humanos, las fosas nasales del hombre constituyen el reservorio principal del germen, desde donde se disemina a piel, manos, rostro, pelo, etcétera. Por otro lado, también se encuentran en el ambiente: aire, suelos, aguas, vestidos, entre otros, los alimentos expuestos

a la manipulación humana tienen la posibilidad de contaminarse con esta especie bacteriana (42). Es precisamente el lavado de manos, un punto fundamental de observación, pues los microbios en las manos sin lavar pueden llegar a los alimentos cuando las personas los preparan o los consumen, estos microorganismos pueden multiplicarse en algunos tipos de alimentos bajo determinadas condiciones, y hacer que las personas se enfermen. Por lo tanto, eliminar los microorganismos mediante el lavado de manos ayuda a prevenir la diarrea y las infecciones respiratorias e, incluso, puede ayudar a prevenir infecciones en la piel y los ojos (44). Se debe fomentar el lavado de manos de los manipuladores, ya que es una práctica sencilla y sin costo.

- Referente al análisis de *Salmonella sp.* no se encontró en ninguna muestra analizada, posiblemente porque la bacteria ha demostrado dificultad de detectarse en este tipo de alimentos, debido a que se encuentra en concentraciones mínimas y en presencia de una gran cantidad de organismos competitivos (45), resultado similar se obtuvo en otra investigación, en donde el 100% de las muestras analizadas reportó ausencia de *Salmonella sp.* (40), por el contrario, en otra investigación si se encontró este microorganismo, 14,46% de las pollerías analizadas superó el límite permisible para *Salmonella sp.* (41). Por otra parte, los alimentos que con más frecuencia dan lugar a casos de salmonelosis son: carnes y productos cárnicos, algunos productos de charcutería, carnes de aves y subproductos, huevos y ovoproductos, leche y productos derivados de la leche (39), la presencia de este microorganismo no es significativa en ensaladas de verduras, a excepción de que puede contener *Salmonella* cuando se cultivan en aguas residuales contaminadas o son fertilizadas con abonos de origen animal (45).
- Estos resultados se pueden atribuir a diferentes causas, como los factores higiénico-sanitarios: el diseño del establecimiento, salud, higiene y capacitación del personal, que cuentan con carnés de sanidad vencidos o que simplemente no tienen carné, no aplican las BPM, no cuentan con indumentaria completa, se verificó presencia de polvos sobre las superficies, presencia de objetos que no corresponden al área de cocina, así como de vectores y heces de roedores, tampoco cuentan con un área de disposición de residuos sólidos o están en mal estado de conservación e higiene. (14). En suma, es necesario la educación de los manipuladores de alimentos y personas que estén en contacto con los mismos, a los cuales se les debe enseñar a comprender la importancia de su trabajo y deben conocer el sentido que tiene la importancia del lavado de manos antes y después de manipular los alimentos, la higiene personal, la limpieza escrupulosa de la cocina y la protección de los alimentos frente a su contaminación a través de roedores o insectos, todo ellos para la prevención de enfermedades, además, los manipuladores deben conocer la existencia de microbios y sus consecuencias, siendo un deber sensibilizarlos en problemas de higiene (42).

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se evaluó la calidad microbiológica de las ensaladas elaboradas en las pollerías del centro poblado Las Américas de acuerdo a los criterios microbiológicos establecidos por la Normas Sanitarias, que establecen las condiciones microbiológicas que deben cumplir los alimentos elaborados para ser considerados aptos para el consumo humano. De los 16 locales de pollerías, el 100% cumple con la normativa respecto a aerobios mesófilos y *Salmonella sp.*, el 81,3% obtuvo niveles inaceptables de coliformes, 68,8% de *E. coli* y 75% de *S. aureus*. Con estos resultados se puede afirmar que, en promedio el 54,9% de las pollerías cumplen con los criterios microbiológicos, los locales 7 y 8, presentan condiciones microbiológicas permisibles, a diferencia del local 1, que posee el recuento más alto. Es importante precisar que, aunque el estudio abarcó un solo centro poblado, los resultados dan una idea del nivel de higiene en estos tipos de restaurantes y además sugieren la posibilidad de que el nivel de higiene que se encontró en las ensaladas, se mantenga en otros establecimientos, no sólo del lugar donde se desarrolló el estudio.
- Se determinó el nivel de microorganismo indicador de alteración: aerobios mesófilos, el 100% (16/16) cumple con los parámetros establecidos, los locales 1 (13×10^4 UFC/g), 2 (13×10^4 UFC/g), 3 (12×10^4 UFC/g) y 15 (13×10^4 UFC/g), obtuvieron los recuentos más altos, a diferencia de los locales 7 (86×10^2 UFC/g) y 8 (8×10^3 UFC/g) donde se obtuvieron los recuentos más bajos.
- Se determinó el nivel de microorganismos indicadores de higiene: coliformes y *E. coli*. Respecto al recuento de bacterias coliformes, solo 3 locales, 2 (8×10 UFC/g), 3 (8×10 UFC/g) y 11 (1×10 UFC/g), es decir, solo el 18,7% (3/16) califica dentro de los parámetros establecidos, los locales 1 (46×10 NMP/g) y 5 (46×10 NMP/g), representan los recuentos más altos. Respecto al análisis microbiológico de *E. coli*, los locales 1 (7 NMP/g), 2 (7 NMP/g), 3 (7 NMP/g), 8 (7 NMP/g) y 11 (7 NMP/g), se encuentran dentro de los parámetros permisibles, representando solo el 31,2% (5/16), los locales 14 y 16, obtuvieron los resultados más altos, 28×10 NMP/g para ambos casos.
- Se determinó el nivel de microorganismos patógenos: *S. aureus* y *Salmonella sp.* Se encontró *S. aureus* en 12 de las 16 muestras analizadas, es decir 75% fuera de los parámetros establecidos, dentro de los cuales, los locales 6 (52×10^2 UFC/g) y 13 (55×10^2 UFC/g) muestran los recuentos más altos, el 25% lo representan los locales 5, 7, 8 y 9, cuyos resultados son permisibles. Respecto a la presencia de *Salmonella sp.*, no se reportó en ninguno de los locales, cumpliendo con lo establecido por la NTS N°071-MINSA/DIGESA (ausencia/ 25g de *Salmonella*).

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda a los municipios locales a través de sus autoridades y funcionarios (DIGESA y otros), realizar la vigilancia higiénica sanitaria periódicamente para garantizar la calidad de los productos que se expenden, así como también comprobar la calidad microbiológica de los productos listos para su consumo. Además de solicitar a estas autoridades que se planifiquen y realicen programas de capacitación constante a los vendedores y manipuladores de alimentos sobre las buenas prácticas de manipulación y su importancia en la salud de los consumidores.
- Incluir programas de capacitación en la preparación de alimentos con alto riesgo microbiano, sobre todo microorganismos patógenos, como *Salmonella sp.*, en especial a este tipo de establecimientos que tiene gran acogida por los comensales.
- A instituciones como el MINSA, Municipios y profesionales de la salud, se invita a continuar con las investigaciones de los alimentos que se expenden no solo en las demás pollerías, sino también en restaurantes de toda la ciudad, para conocer la calidad microbiológica, condiciones higiénicas y otros aspectos de importancia, contribuyendo de esta manera con la salud pública.
- El estudio de calidad de agua que se emplean en la elaboración de comidas para el consumo humano en los establecimientos comerciales, también es un tema de investigación, debido a que son un vehículo de transmisión de microorganismos patógenos importante.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. **Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.** *Manuales para el control de calidad de los alimentos. 9. Introducción a la toma de muestras de alimentos.* Roma, 1989.
2. **Consejería de Empleo y Desarrollo Tecnológico.** *Manipulación de Alimentos (Manual común).* España : Prescal, 2010.
3. **Viñas, Inmaculada.** *Aspectos microbiológicos relacionados con el procesado de frutas y hortalizas.* España : 2015.
4. **Kopper, Gisella, y otros.** *Enfermedades Transmitidas por Alimentos y su impacto socioeconómico.* Roma : 2009.
5. **MINSA, MINISTERIO DE SALUD.** *Boletín Epidemiológico del Perú.* Lima : 2016.
6. *Boletín Epidemiológico del Perú.* Lima : 2017.
7. **Dirección Regional de Salud, Oficina de Salud Ambiental de Abancay, Área de Epidemiología.** *Tasa de incidencia de ETA.* Abancay : 2019.
8. **Laura Acevedo, Clever Mendoza y Rafael Oyón.** *Coliformes totales, fecales y algunas enterobacterias, Sthaphylococcus sp. y hongos en ensaladas para perro calientes expendidas en la ciudad de Maracay, Venezuela.* 4, Maracay, Venezuela : Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela- Maracay. Venezuela, 2001, Vol. 51.
9. **Arias-Echandi M., Antillón F.** *Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica. Una revisión de 10 años.* 2, Costa Rica : Sección de Microbiología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, 2000, Vol. 11.
10. **Gentili, Alejandro Raúl, y otros.** *Calidad bacteriológica de ensaladas de zanahoria rallada y eficacia de tratamientos previos a su consumo.* 1, Buenos Aires : Revista de Salud Pública y Nutrición, 2017, Revista de Salud Pública y Nutrición, Vol. 16, págs. 9-15.
11. **Martel Tolentino, Wilder Javier, Escobedo Bailon, Chistian y Ariza Avila, Ernestina.** *Contaminación fecal de ensaladas expendidas en las principales pollerías de Huánuco.* 1, Perú : Investigación Valdizana, 2015, Investigación Valdizana, Vol. 9, págs. 43-46.
12. **Quispe, Juan y Sánchez, Víctor.** *Evaluación microbiológica y sanitaria de puestos de venta ambulatoria del distrito de Comas, Lima - Perú.* 1-2, Lima : 2001, Revista peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, Vol. 18, págs. 27-32.

13. **Rivera Jacinto, Marco, Rodríguez Ulloa, Claudia y López Orbegoso, John.** *Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercados de la ciudad de Cajamarca, Perú.* 1, Perú : 2009, Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, Vol. 26, págs. 45-48.
14. **Mamani, Luzmila.** *Inspección a restaurant en el distrito de Abancay.* Dirección Ejecutiva de Salud Ambiental (DESA) – Área de Higiene Alimentaria y Zoonosis. Abancay : 2013. Informe de practica preprofesional realizado en la Dirección Regional de Salud (DIRESA).
15. **López, Andrés.** *Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. Del campo al mercado.* Balcarce, Argentina : Boletín de servicios agrícolas de la FAO, 2003.
16. **Leonor Carrillo, Marcela Audisio, con la colaboración de Bejarano N, Gómez S, Ancasi E y Benítez M.** *Manual de Microbiología de los Alimentos - Capítulo 7.* 1ra. Jujuy : Impreso por la Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNJU, SS Jujuy, 2007.
17. **W. C. Frazier, D. C. Westhoff.** *Microbiología de los alimentos.* 4ta. Zaragoza : Acribia, S.A., 1993.
18. **RESOLUCION MINISTERIAL N° 591-2008/MINSA -DIGESA.** NTS N°071-MINSA-DIGESA-V.1 Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano. *El Peruano.* 378827, 29 de Agosto de 2008.
19. **Escartin, E.** *Microbiología e inocuidad de los alimentos.* México : 2000.
20. **Andino, Flavia y Castillo, Yorling.** *Microbiología de los alimentos.* Estelí : 2010.
21. **Organización Panamericana de la Salud.** OPS. [En línea] Oficina Regional para las Américas de la Organización Mundial de la Salud, Julio de 2003. [Citado el: Domingo de Octubre de 2019.] https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10835:2015-peligros-introduccion&Itemid=41449&lang=es.
22. **Dirección General de Salud Ambiental, DIGESA.** *Manual de Análisis Microbiológico de Alimentos.* Lima : s.n., 2001.
23. **Aracely Rodríguez de León.** *Determinación de Escherichia coli en ensaladas.* Guatemala : 2005.
24. **Ministerio de Salud y Protección Social. Instituto Nacional de Salud INS.** *Evaluación de riesgos de Staphylococcus aureus enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia.* Bogotá : s.n., 2011.
25. **Koneman, E.** *Diagnóstico Microbiológico.* Quinta edición. s.l. : Editorial Panamericana, 1999.
26. **Fernández, E. E.** *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos.* México : s.n., 2008.
27. *Enfermedades asociadas a alimentos.* DC., **Pigott.** 2008, Foodborne illness, págs. 475-97.

28. **Navarro, Ramón Bertó.** *Staphylococcus aureus en la industria alimentaria*. España : Betelgeux Crhisteyns Food Hygiene, 2015.
29. **Cervantes García, Estrella, García González, Rafael y Salazar Schettino, Paz María.** *Características generales del Staphylococcus aureus*. 2014, Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio, págs. 30-31.
30. **Durango, Johnny, Arrieta, Germán y Mattar, Salim.** *Presencia de Salmonella spp. en un área del Caribe colombiano: un riesgo para la salud pública*. 1, Marzo de 2004, Biomédica, Vol. 24, págs. 89-96.
31. **Cabello, Raúl.** *Microbiología y Parasitología Humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 3ra. 2007.
32. **Comité Científico de Seguridad Agroalimentaria.** *Evaluación del riesgo: Asociado a la presencia de los serovares zoonóticos de Salmonella en huevo fresco producido en la CAE*. España : 2008.
33. **Larry M., Bush y Charles E., Schmidt.** Manual MSD Versión para profesionales. [En línea] Merck Sharp & Dohme Corp., Octubre de 2018. <https://www.msmanuals.com/es-pe/professional/enfermedades-infecciosas/biolog%C3%ADa-de-las-enfermedades-infecciosas/factores-que-facilitan-la-invasi%C3%B3n-microbiana>.
34. **Navia, Diana P., Villada, Héctor S. y A., Morquera Silvio.** *Las Biopelículas en la Industria de Alimentos*. 2, Popayán, Colombia. : Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 2010, Vol. 8.
35. **Zambrano, María Angélica y Suárez Londoño, Lina.** *Biofilms bacterianos: sus implicaciones en salud y enfermedad*. 57 : Universitas Odontológica, 2006, Redalyc org., Vol. 25, págs. 19-25.
36. **García, Adriana.** *Enfermedades Transmitidas por Alimentos*. Bogotá : 2014.
37. **OPS/OMS.** *Manual de Capacitación para Manipuladores de Alimentos*.
38. **Diaz Sobac, R; Vernon Carter, J.** *Inocuidad microbiológica de frutas fresca y mínimamente procesadas. Ciencia, tecnología y alimentación*. España : s.n., 1999. Vol. 2. 3.
39. **M.a del Rosario Pascual y Vicente Calderón y Pascual.** *Microbiología alimentaria. metodología analítica para alimentos y bebidas*. Madrid, España : Editorial Diaz de Santos S.A. 2da edición, 2000.
40. **Avalos Alas, Cindy Yamileth y Santacruz Martínez, Fátima del Rosario.** *Determinación de contaminantes microbiológicos en las ensaladas frescas que se comercializan en establecimientos de comida rápida del distrito dos de la zona metropolitana de San Salvador*. San Salvador : Tesis Doctoral. Universidad de El Salvador., 2009.

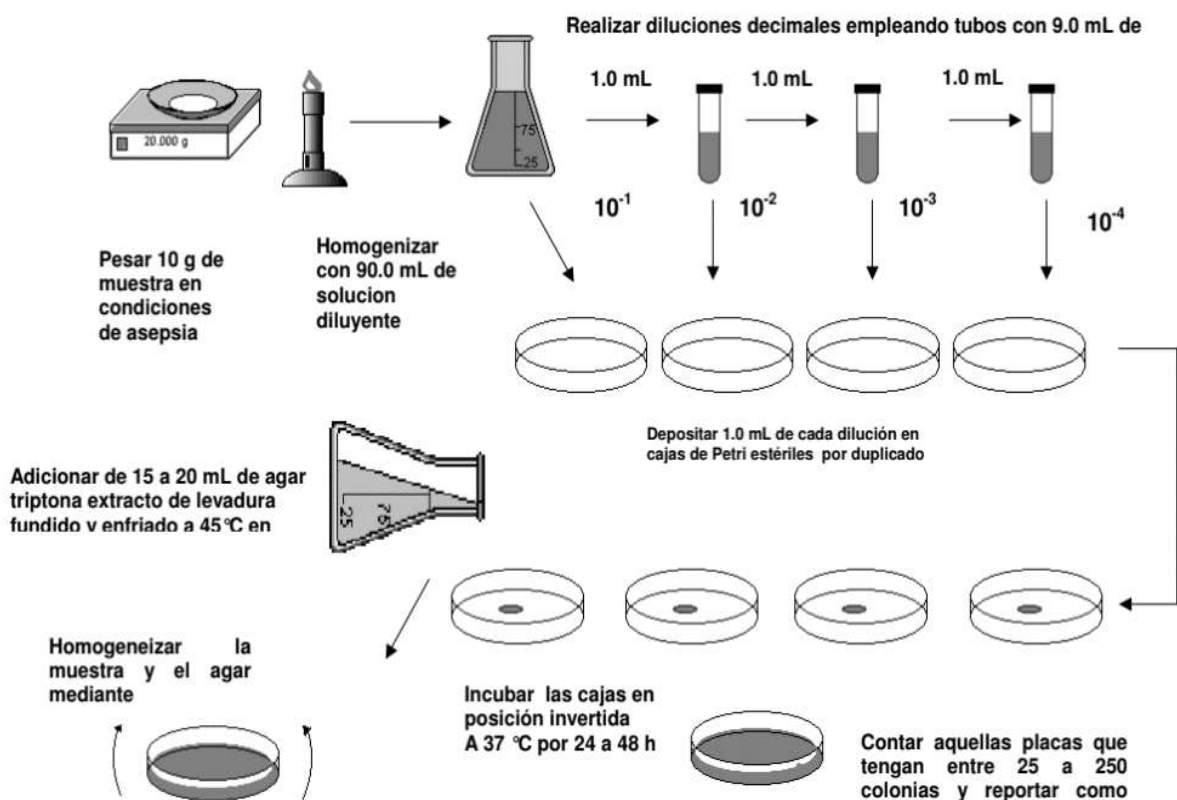
41. **Soberon Amado , Jaqueline Getrudis.** *Calidad microbiana y Listeria monocytogenes en ensaladas expandidas en pollerías del distrito de los Olivos–Lima, Perú.* Lima : 2017.
42. **Bravo, Francisco.** *El manejo higiénico de los alimentos. Guía para la obtención del distintivo H.* México : Editorial LIMUSA S.A. DE C.V. Grupo Noriega Editores, 2004.
43. **García M. et al.** *Ats/dué Vol. Ii. Personal Laboral de la Comunidad Autonoma de Extremadura.* Comunidad Autonoma de Extremadura. España. : Editorial MAD, 2006.
44. **Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades.** Lavado de Manos. [En línea] CDC, 22 de Julio de 2015. [Citado el: 09 de Mayo de 2019.] <https://www.cdc.gov/handwashing/esp/why-handwashing.html>.
45. **Ma del Rosario; Pascual Anderson.** *Enfermedades de origen alimentario. Su prevención.* España : Editorial Diaz de Santos S.A., 2005.
46. **Aquino, Pavel.** *Calidad del agua en el Perú. Retos y aportes para una gestión sostenible en aguas residuales.* Lima : Editado por Derecho, Ambiente y Recursos Naturales (DAR), 2017.
47. **Díaz, Carolina.** *Adherencia y colonización de Pseudomonas fluorescens sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie.* : Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas., 2011.

ANEXOS

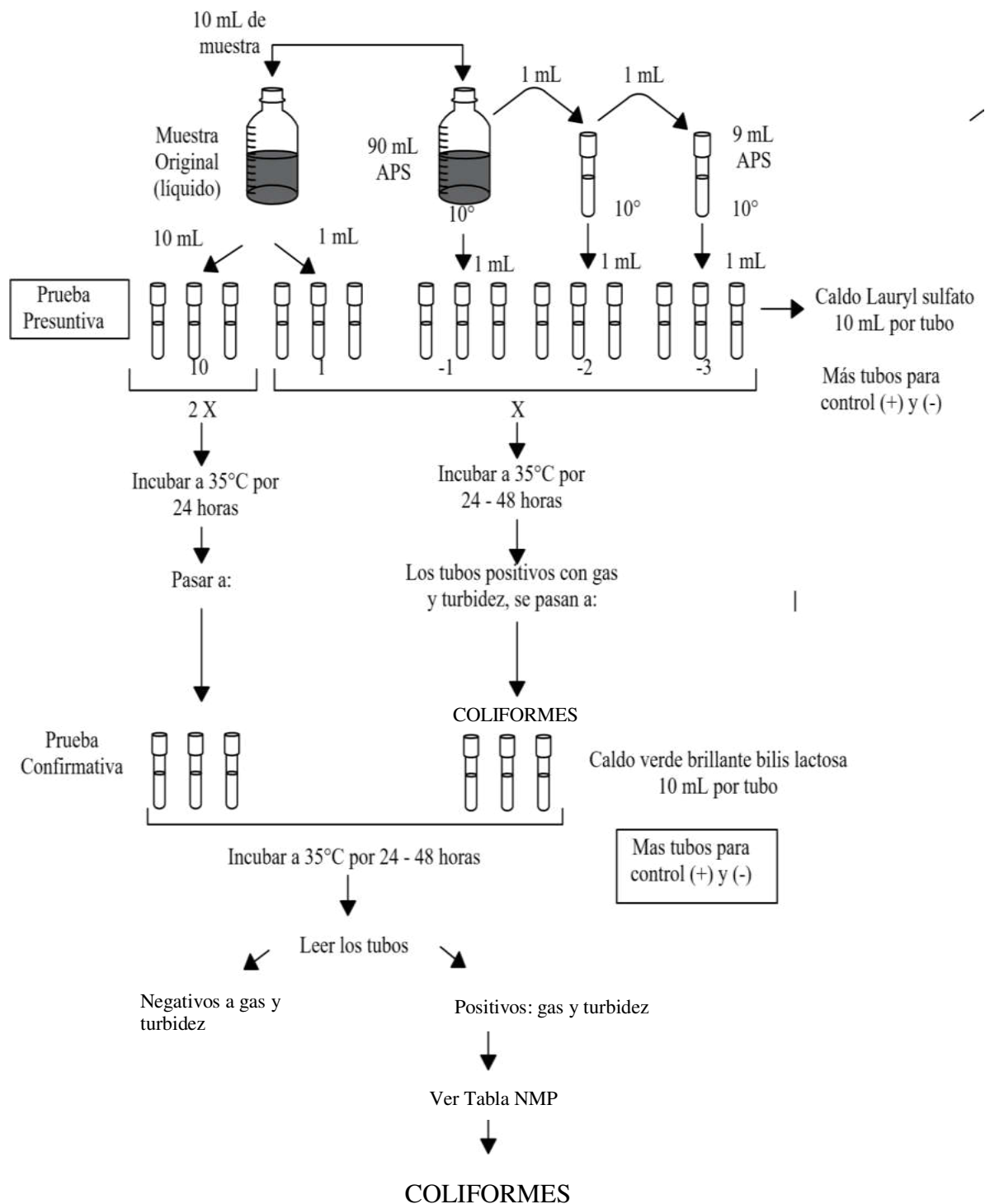
Anexo 1. Relación de pollerías-restaurante del centro poblado Las Américas, según información de la Municipalidad Provincial de Abancay, área de rentas (2017).

Propietario	Giro del negocio	Dirección	RUC
Silvia Oscco Chacón	Restaurante- Pollería	Argentina 340	10470431151
Jhon Huamán Jacobe	Pollería- Restaurante	Venezuela 811	10481138618
Ccanri Quispe, Clara	Restaurante- Pollería	Las Malvinas S/N	10419900686
Rodríguez Mendoza Maribel	Restaurante- Pollería	Av. Las Malvinas S/N	10466245238
Huamán Jacobe Carlos Alfredo	Pollería	Av. Venezuela 619 2do Y 3er Piso	10800161679
Quispe Chávez Oscar	Pollería	Av. Venezuela 703 2do Piso	10421051653
El Palacio Del Pollo E.I.R. L	Pollería	Av. Venezuela 801	20564372073
Morales Huaraca Jeferson	Pollería Y Parrillas	Av. Venezuela 719	10472159092

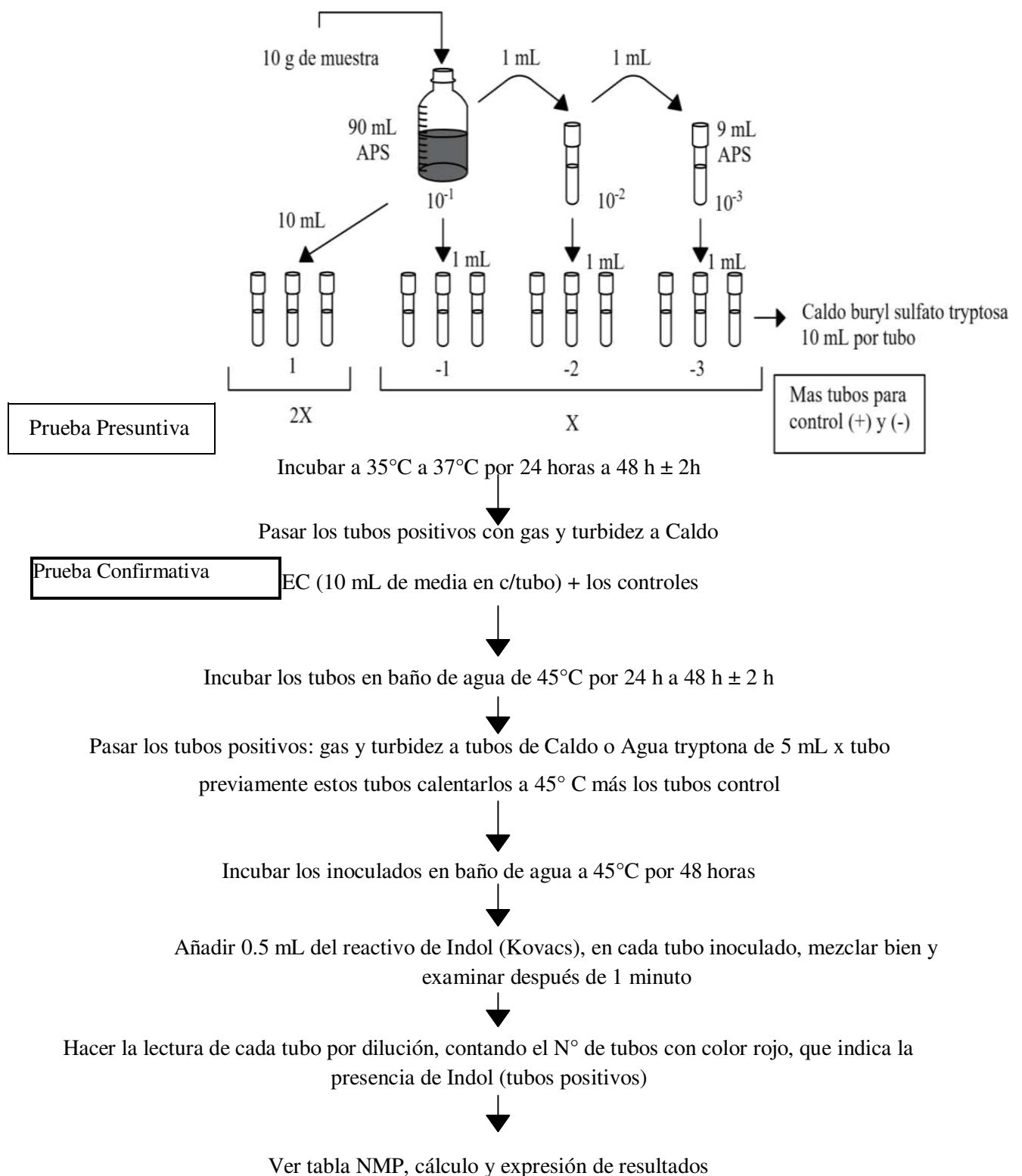
Anexo 2. Diagrama de secuencia de análisis de aerobios mesófilos viables



Anexo 3. Diagrama de secuencia de análisis de Coliformes Totales. ISO 4831: 2006



Anexo 4. Diagrama de secuencia de análisis de *Escherichia coli*. ISO 7251: 1993.

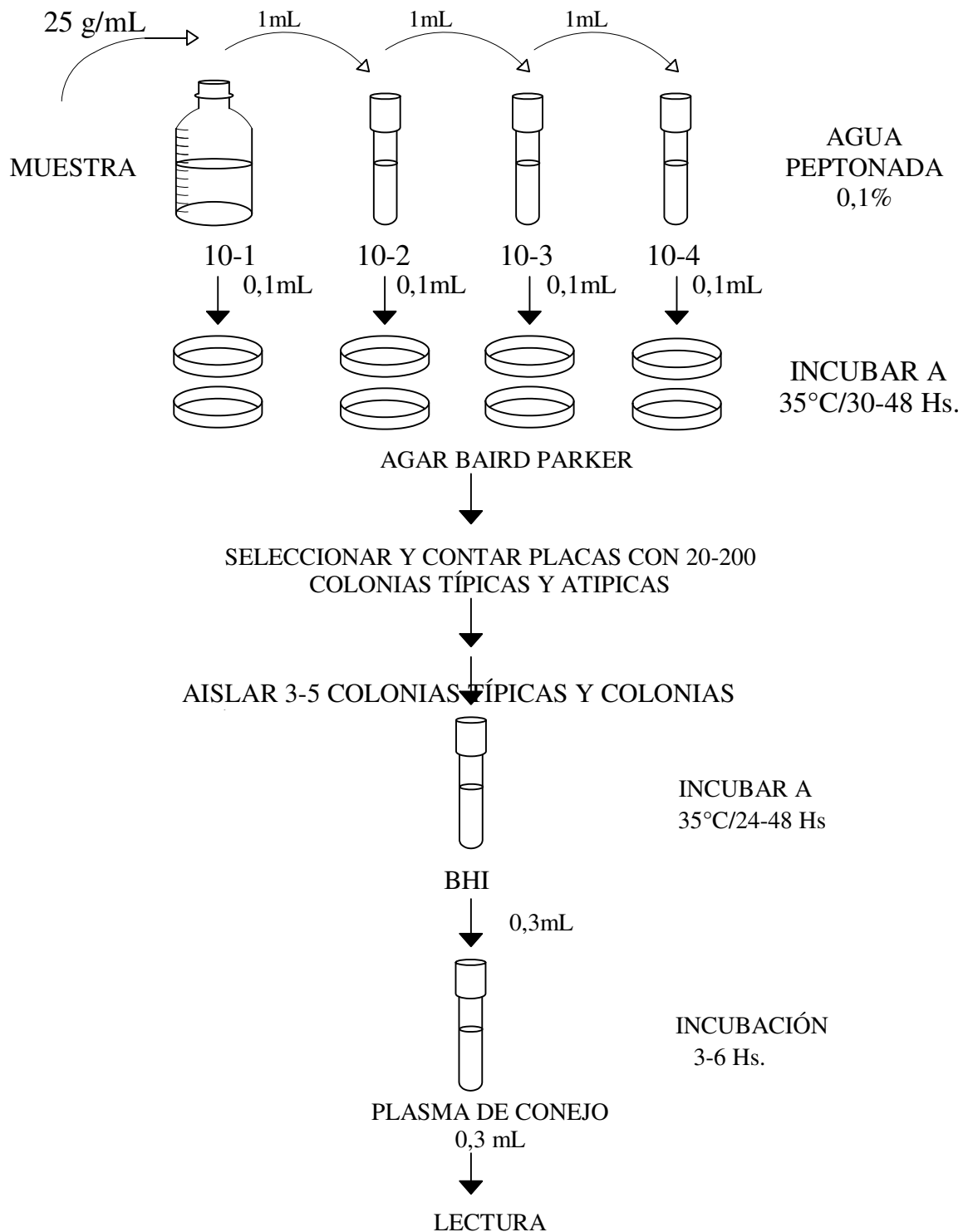


Anexo 5. Tabla NMP para tubos cada uno 0.1, 0.01 y 0.001 gramos de inóculo, los NMPs por gramo y 95% de intervalo de confianza. ISO 7218:2007- 3RA. Edición, pág. 60

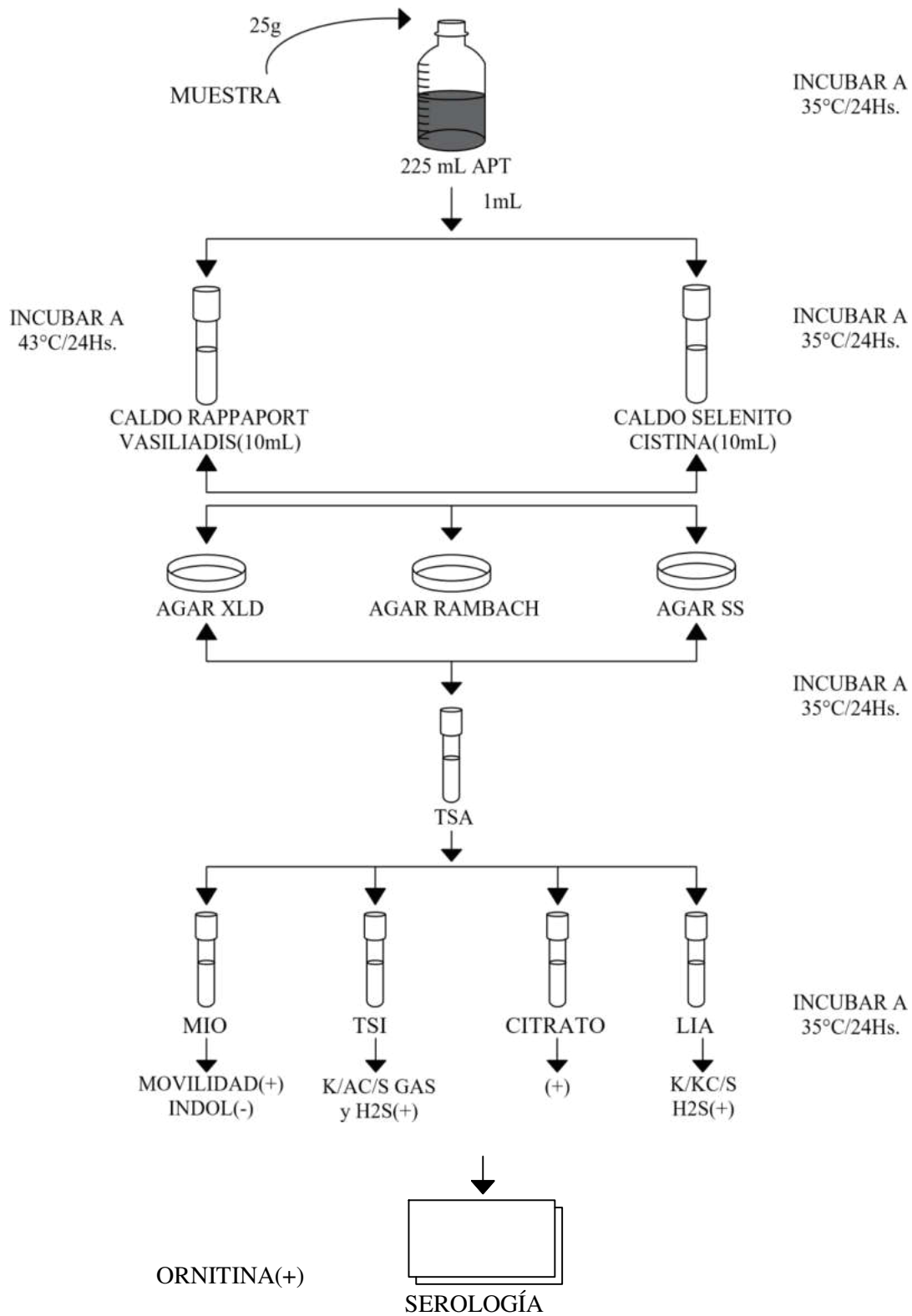
Tubos positivos			NMP/g	Tubos positivos			NMP/g
0.10	0.01	0.001		0.10	0.01	0.001	
0	0	0	<3.0	2	2	0	21
0	0	1	3.0	2	2	1	28
0	1	0	3.0	2	2	2	35
0	1	1	6.1	2	3	0	29
0	2	0	6.2	2	3	1	36
0	3	0	9.4	3	0	0	23
1	0	0	3.6	3	0	1	38
1	0	1	7.2	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7.4	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	9.2	3	2	2	210
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

Anexo 6. Diagrama de secuencia de análisis de *Staphylococcus aureus* ISO 8388-1: 1998.

NUMERACIÓN DE *Staphylococcus aureus* COAGULASA POSITIVO



Anexo 7. Diagrama de secuencia de investigación de *Salmonella sp.* ISO 6579: 2002



Anexo 8. Resultados del recuento en placa para aerobios mesófilos en muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en UFC/g

Numero de muestra	Dilución	Recuento estándar en placa estimado 1*	Recuento estándar en placa estimado 2*	Promedio de recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)
1	10 ⁻¹	MNPC	MNPC	MNPC
	10 ⁻²	1496	1376	14 x10 ⁴
	10 ⁻³	118	126	12 x10 ⁴
2	10 ⁻¹	MNPC	MNPC	MNPC
	10 ⁻²	1064	1140	11 x10 ⁴
	10 ⁻³	152	131	14 x10 ⁴
3	10 ⁻¹	MNPC	MNPC	MNPC
	10 ⁻²	1208	1136	12 x10 ⁴
	10 ⁻³	131	117	12 x10 ⁴
4	10 ⁻¹	MNPC	MNPC	MNPC
	10 ⁻²	728	784	76 x10 ³
	10 ⁻³	80	69	75 x10 ³
5	10 ⁻¹	MNPC	MNPC	MNPC
	10 ⁻²	908	876	89 x10 ³
	10 ⁻³	99	85	92 x10 ³
6	10 ⁻¹	MNPC	MNPC	MNPC
	10 ⁻²	640	576	61 x10 ³
	10 ⁻³	61	47	54 x10 ³
7	10 ⁻¹	135	151	14 x10 ²
	10 ⁻²	13	25	19 x10 ²
	10 ⁻³	2	2	2 x10 ³
8	10 ⁻¹	788	819	8 x10 ³
	10 ⁻²	89	76	8 x10 ³
	10 ⁻³	10	6	8 x10 ³
9	10 ⁻¹	1288	1256	13 x10 ³
	10 ⁻²	122	149	14 x10 ³
	10 ⁻³	9	15	12 x10 ³
10	10 ⁻¹	MNPC	MNPC	MNPC
	10 ⁻²	440	384	41 x10 ³
	10 ⁻³	42	29	36 x10 ³
11	10 ⁻¹	238	201	22 x10 ²
	10 ⁻²	24	35	3 x10 ³
	10 ⁻³	2	3	25 x10 ²
12	10 ⁻¹	MNPC	MNPC	MNPC
	10 ⁻²	768	792	78 x10 ³
	10 ⁻³	68	91	8 x10 ⁴
13	10 ⁻¹	4816	5512	52 x10 ³
	10 ⁻²	544	592	57 x10 ³
	10 ⁻³	60	48	54 x10 ³
14	10 ⁻¹	MNPC	MNPC	MNPC
	10 ⁻²	832	904	87 x10 ³
	10 ⁻³	95	83	89 x10 ³
15	10 ⁻¹	MNPC	MNPC	MNPC
	10 ⁻²	1240	1288	13 x10 ⁴
	10 ⁻³	121	147	13 x10 ⁴
16	10 ⁻¹	MNPC	MNPC	MNPC
	10 ⁻²	952	920	94 x10 ³
	10 ⁻³	95	89	92 x10 ³

*Lectura de cada dilución por duplicado

MNPC: Muy numeroso para contar

Anexo 9. Número de tubos positivos para coliformes en las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas.

Número de muestra	Número de tubos positivos		
	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución 10 ⁻³
1	3	3	1
2	3	1	1
3	3	1	1
4	3	2	1
5	3	3	1
6	3	2	3
7	3	2	1
8	3	1	2
9	3	2	2
10	3	2	3
11	1	1	1
12	3	2	2
13	3	3	2
14	3	2	2
15	3	2	3
16	3	3	2

Anexo 10. Número de tubos positivos para *E. coli* en las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas.

Número de muestra	Número de tubos positivos		
	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución 10 ⁻³
1	1	1	0
2	1	1	0
3	1	0	1
4	2	1	1
5	2	1	0
6	1	2	1
7	2	0	1
8	1	0	1
9	2	1	1
10	2	0	1
11	2	1	1
12	2	1	1
13	2	1	1
14	2	2	1
15	2	1	1
16	2	2	1

Anexo 11. Resultados de las diluciones de *S. aureus* en las muestras de ensaladas de pollerías del centro poblado Las Américas, expresados en UFC/g.

Número de muestra	Dilución	Promedio de recuento de <i>S. aureus</i> (UFC/g)
1	10 ⁻¹	11 x10 ²
	10 ⁻²	23 x10 ²
	10 ⁻³	3 x10 ³
2	10 ⁻¹	13 x10 ²
	10 ⁻²	22 x10 ²
	10 ⁻³	2 x10 ³
3	10 ⁻¹	17 x10 ²
	10 ⁻²	22 x10 ²
	10 ⁻³	25 x10 ²
4	10 ⁻¹	12 x10 ²
	10 ⁻²	25 x10 ²
	10 ⁻³	2 x10 ³
5	10 ⁻¹	2 x10
	10 ⁻²	1 x10
	10 ⁻³	<100
6	10 ⁻¹	MNPC
	10 ⁻²	48 x10 ²
	10 ⁻³	55 x10 ²
7	10 ⁻¹	<100
	10 ⁻²	<100
	10 ⁻³	<100
8	10 ⁻¹	<100
	10 ⁻²	<100
	10 ⁻³	<100
9	10 ⁻¹	<100
	10 ⁻²	<100
	10 ⁻³	<100
10	10 ⁻¹	14 x10
	10 ⁻²	15 x10
	10 ⁻³	<100
11	10 ⁻¹	56 x10
	10 ⁻²	95 x10
	10 ⁻³	5 x10 ²
12	10 ⁻¹	64 x10
	10 ⁻²	65 x10
	10 ⁻³	1 x10 ³
13	10 ⁻¹	MNPC
	10 ⁻²	55 x10 ²
	10 ⁻³	6 x10 ³
14	10 ⁻¹	23 x10 ²
	10 ⁻²	25 x10 ²
	10 ⁻³	25 x10 ²
15	10 ⁻¹	19 x10 ²
	10 ⁻²	23 x10 ²
	10 ⁻³	35 x10 ²
16	10 ⁻¹	19 x10 ²
	10 ⁻²	25 x10 ²
	10 ⁻³	2 x10 ³

Anexo 12. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Salmonella sp.* de las muestras de ensalada analizadas.

Número de muestra	Tinción de Gram	TSI	LIA	CITRATO	Resultado <i>Salmonella sp.</i>
2	Gram negativos	A/A	K/A	+	Negativo
3	Gram positivos	A/A	K/A	+	Negativo
5	Gram positivos	A/A	K/K	-	Negativo
6	Gram positivos	A/A	K/A	+	Negativo
8	Gram negativos	K/A	A/A	-	Negativo
9	Gram positivos	K/A	K/A	+	Negativo
10	Gram negativos	A/A	K/A	-	Negativo
11	Gram positivos	A/A	K/K	+	Negativo
12	Gram negativos	A/A	K/A	+	Negativo
15	Gram positivos	A/A	K/K	+	Negativo
16	Gram positivos	A/A	K/A	+	Negativo

Anexo 13. Procedimiento realizado para el análisis microbiológico de ensaladas.



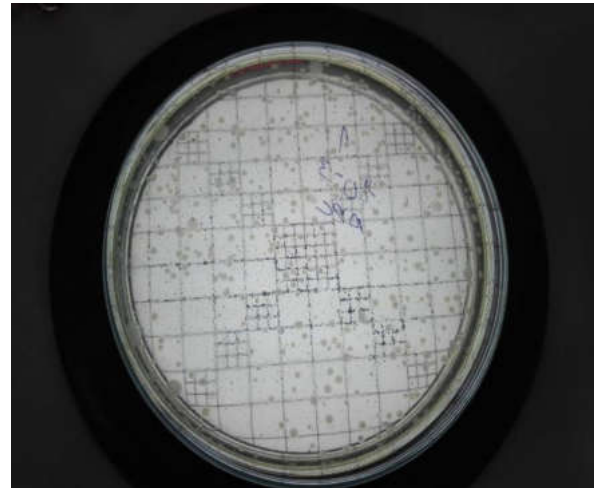
Fotografía 1. Toma de muestras de ensaladas de pollerías.



Fotografía 2. Pesado de muestras para análisis microbiológico.



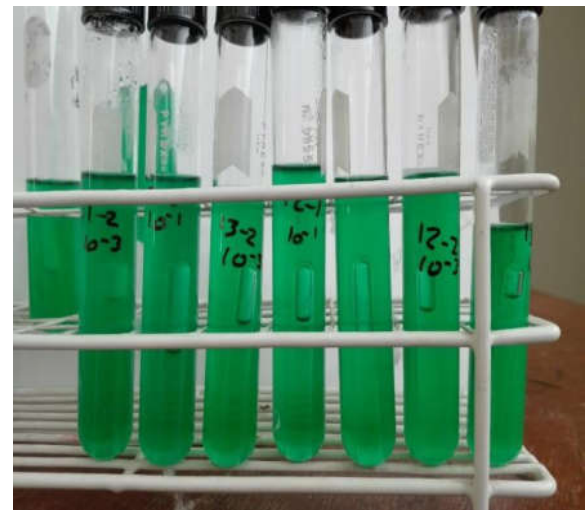
Fotografía 3. Análisis microbiológico de aerobios mesófilos.



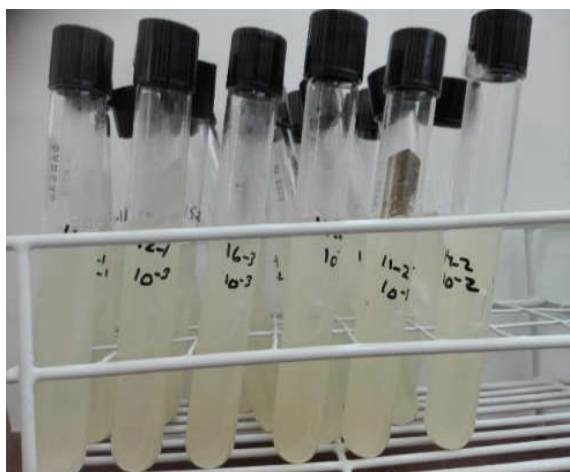
Fotografía 4. Conteo de colonias de aerobios mesófilos.



Fotografía 5. Análisis microbiológico de coliformes y *E. coli*.



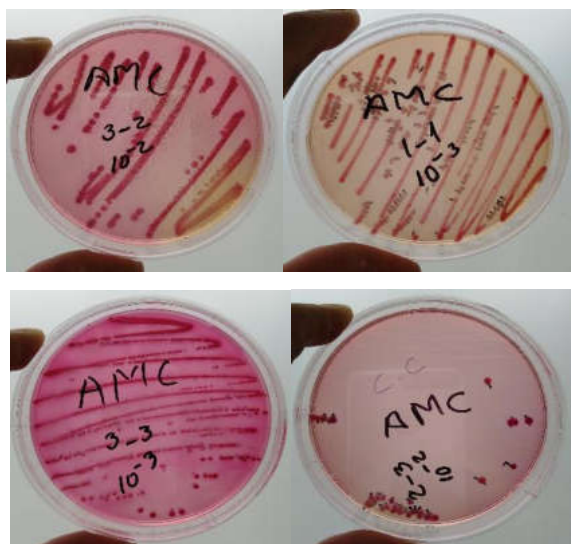
Fotografía 6. Resultados de tubos positivos para coliformes en caldo Brilla 2%



Fotografía 7. Resultados de tubos positivos para *E. coli* en caldo EC.



Fotografía 8. Siembra de tubos positivos para *E. coli* en agar MacConkey.



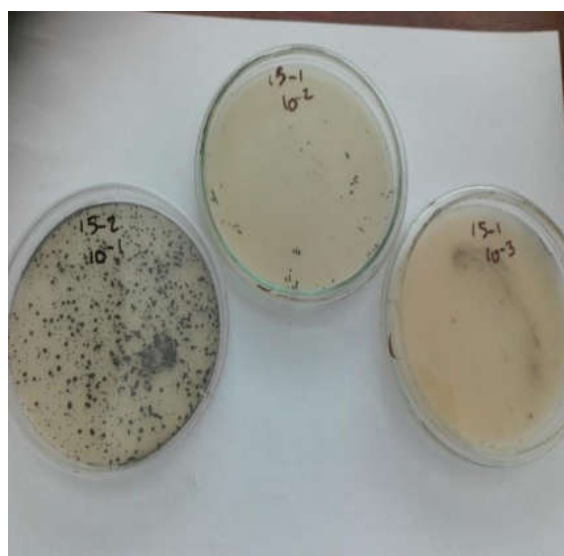
Fotografía 9. Resultados para *E. coli* en agar MacConkey.



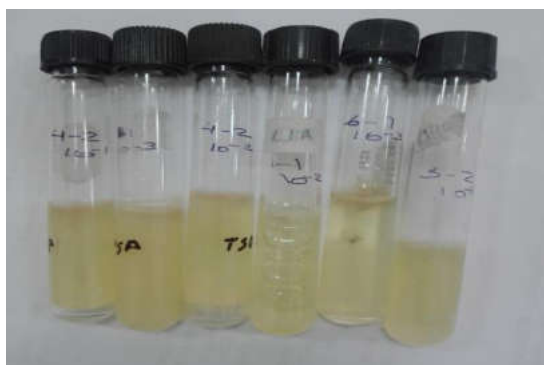
Fotografía 10. Pruebas bioquímicas para la confirmación de *E. coli*.



Fotografía 11. Análisis microbiológico de *S. aureus* en muestras de ensalada.



Fotografía 12. Colonias sospechosas de *S. aureus* en agar Baird Parker.



Fotografía 13. Siembra de colonias sospechosas de *S. aureus* en agar TSA para la prueba de la coagulasa.



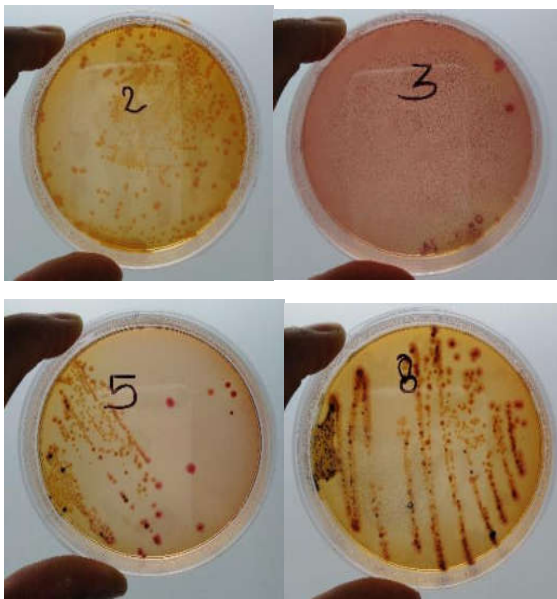
Fotografía 14. Acondicionamiento de la muestra para el análisis microbiológico de *Salmonella sp.*



Fotografía 15. Siembra microbiológica de muestras de ensaladas en caldo RV.



Fotografía 16. Siembra microbiológica de muestras de ensaladas de caldo RV a agar SS.



Fotografía 17. Colonias sospechosas de *Salmonella sp.*



Fotografía 18. Pruebas bioquímicas de colonias sospechosas de *Salmonella sp.*

Anexo 9. Plano referencial del centro poblado Las Américas, proporcionado por la Municipalidad Provincial de Abancay y Municipalidad Las Américas.

