



**DEPARTAMENTO DE POSGRADOS
MAESTRÍA EN GESTIÓN DE CALIDAD Y
SEGURIDAD ALIMENTARIA**

***“DETERMINACION DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN
QUESO FRESCO EXPENDIDO AL GRANEL EN LOS
MERCADOS DE CUENCA”***

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
MAGÍSTER EN GESTIÓN DE CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA**

AUTOR: BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA. MAYRA RITA GARCÍA QUITO

DIRECTOR(A): MARÍA FERNANDA MORALES, MSC.

CUENCA, ECUADOR

2014

DEDICATORIA

A mi Dios por haberme permitido llegar hasta este punto dándome salud sobre todo fortaleza en los momentos difíciles y lograr mis objetivos.

A mis Padres por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien.

A mis hermanos, en especial a Alexandra por ser el ejemplo de una hermana mayor y de la cual aprendí aciertos, momentos difíciles y desde el cielo está conmigo.

A mi enamorado por ser la persona especial en mi vida y mi apoyo en todo momento.

A mis amigos, con quienes continuamente nos apoyamos en nuestra formación profesional.

RESUMEN

El presente estudio tiene como finalidad determinar la presencia o ausencia del patógeno *Listeria monocytogenes* en quesos frescos elaborados artesanalmente y expendidos en cuatro mercados principales de la ciudad de Cuenca, siendo estos la Feria Libre, Nueve de Octubre, Diez de Agosto y Doce de Abril, debido que es un producto de alto consumo.

Se analizaron sesenta muestras de quesos, el muestreo fue de quince locales dentro de los cuatro mercados, de cada local se realizó una repetición de tres veces para reafirmar que los resultados obtenidos sean confiables, se efectuó por el método de inmunocromatografía de flujo lateral en 25 gr de muestra según los requerimientos basados en la norma ecuatoriana INEN 1528-2012, las muestras fueron recolectados en dos periodos y posteriormente analizadas en el laboratorio de microbiología de la Universidad del Azuay y validado en un laboratorio certificado AVVE de la Ciudad de Guayaquil.

Los resultados obtenidos están basados en variables dependientes para el crecimiento del patógeno, sin embargo el aislamiento para *Listeria monocytogenes* fueron negativos.

PALABRAS CLAVE

Listeria monocytogenes, Queso, Embarazo, Aborto, Mercados.

ABSTRACT

The present study aims to determine the presence or absence of the pathogen *Listeria monocytogenes* in soft and artisanal cheese expended in the four major fresh produce markets in the city of Cuenca: Feria Libre, Nueve de Octubre, Diez de Agosto and Doce de Abril.

Because it is a product of high consumption, sixty cheese samples were analyzed. The sampling was taken from fifteen places within the four mentioned markets. Each sample taken in the different places was analyzed three times so as to make sure that the results obtained were reliable. The analysis was performed in 25 grams sample by the lateral flow immunochromatographic assay according to the 1528-2012 regulation established by the Ecuadorian Institute of Standarization (INEN). The samples were collected in two periods and subsequently analyzed in the laboratory of microbiology at Universidad del Azuay and validated by an AVVVE certified laboratory from the city of Guayaquil.

The results are based on dependents variables for the pathogen growth; however the isolation for *Listeria monocytogenes* was negative.

KEYWORDS

Listeria monocytogenes, Cheese, Pregnancy, Abortion, Markets




Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

INDICE

DEDICATORIA.....	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUCCIÓN	7
Listeriosis	9
Patogenia	9
Manifestaciones Clínicas	10
Contaminación de los Alimentos por <i>Listeria monocytogenes</i>	11
Principios del ensayo de Kit de inmunocromatografía de flujo lateral	11
CAPITULO I	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
1.1. Localización del lugar de estudio	14
1.2. Localización de los sitios de análisis de laboratorio	14
1.3. Metodología de muestreo	14
1.4. Determinación de <i>Listeria monocytogenes</i> por inmunocromatografía	14
1.5. Variables del Muestro	14
1.6. Procedimiento	15
1.7. Validación de la técnica de determinación de <i>Listeria monocytogenes</i> en Quesos Frescos.	15
CAPÍTULO II	17
RESULTADOS.....	17
2.1. Valores obtenidos en el estudio de <i>Listeria monocytogenes</i>	17
CAPÍTULO III	22
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	24
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	25
REFERENCIAS ELECTRONICAS	27
ANEXOS	29
ANEXO 1: Resultados de validación del método realizado en laboratorio externo AVVE del análisis de la contra muestra de queso fresco recogida en los mercados de la Ciudad de Cuenca.	29
Anexo 2: Procedimiento mediante el método de Reveal 2.0	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Análisis descriptivo	17
Tabla N° 2: Análisis de Relación de Variables	18
Tabla N° 3: Determinación de ausencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de queso fresco analizadas.	19
Tabla N° 4: Requisitos microbiológicos Norma INEN 1528:2012 para <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco no madurados	19
Tabla N° 5: Validación de la muestra de queso realizado por el método Reveal 2.0 en el laboratorio certificado AVVE de la ciudad de Guayaquil	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Hábitat de <i>Listeria monocytogenes</i> y vías de contaminación	11
Figura N° 2: Ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral	12

INDICE DE GRAFICAS

GRAFICA N° 1: Resultados de determinación de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de queso frescos expandido en los mercados de la ciudad de Cuenca	20
GRAFICA N° 2: Resultados de determinación de <i>Listeria monocytogenes</i> dependiente de los factores intrínsecos y extrínsecos	21
GRAFICA No. 3: Determinación de variables para la supervivencia y crecimiento de <i>Llisteria monocitógenes</i>	21

“DETERMINACION DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN QUESO FRESCO EXPENDIDO AL GRANEL EN LOS MERCADOS DE CUENCA”

INTRODUCCIÓN

La listeriosis transmitida por alimentos es una enfermedad relativamente poco común, pero grave, con tasas de letalidad altas (20-30%), comparadas con las de otros microorganismos patógenos transmitidos por alimentos (Caballero A, 2008). La enfermedad afecta principalmente a la población cuya vulnerabilidad es mayor. La *Listeria monocytogenes* es un patógeno oportunista que casi siempre afecta a personas con una enfermedad o circunstancia subyacente grave (por ejemplo, inmunodepresión, VIH/SIDA, afecciones crónicas, como la cirrosis, que producen inmunodeficiencia; a mujeres embarazadas; a fetos y recién nacidos; y a personas geriátricas.

La *Listeria monocytogenes* está ampliamente extendida en el ambiente y en los alimentos, como vía primaria de transmisión del patógeno a las personas según el Codex Alimentarius ha sido reconocida como una enfermedad humana desde la década de 1930, pero no fue sino hasta la década de 1980, cuando se produjeron, brotes en Norteamérica y Europa.

Una característica importante de la listeriosis transmitida por alimentos es que el patógeno puede multiplicarse a temperaturas de 30 a 37°C y a temperaturas de refrigeración hasta alcanzar cifras significativas y poder ocasionar la enfermedad, también depende de la disponibilidad e integridad del alimento por ejemplo, la temperatura máxima del alimento en el punto de expendio. Aunque la listeriosis es una enfermedad relativamente poco común, cuando se producen epidemias, la sitúan entre las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor relevancia social y económica (OMS/FAO 2003)

En su reciente revisión de datos referentes a la listeriosis humana, el Grupo de Trabajo de la Organización Mundial de la Salud, “considera que la infección alimentaria se transmite predominantemente de forma mono-zoótica. Porque, aunque el suelo sea la fuente, la transmisión al hombre se produce principalmente desde el medioambiente a través de animales y superficies de alimentos”. De este modo, la *Listeria monocytogenes* debe considerarse como una bacteria medioambiental cuya transmisión al hombre se produce principalmente mediante el consumo de alimentos que se han contaminado durante su elaboración y su producción.(Rev Chil Infect Santiago,2008).

Según cifras del Minsal, en abril del 2013 se han registrado 34 casos confirmados y 5 fallecidos por *listeria monocytogenes*, en el 2012 hubo 89 casos en total. (MSP Chile)

En el Ecuador se registró un el 8 de septiembre del 2008 un caso en el Hospital Pediátrico “Gilbert Elizalde” de la ciudad de Guayaquil en la que se reportó un caso de listeriosis

neonatal. (kittyle M,2009).

En Estados Unidos en el 2011 se han registrado 21 muertes, 109 personas se han enfermado del brote en 23 estados, desde California hasta la Costa Este y dentro de estos casos, uno manifestado como aborto espontáneo. (Centers for Disease control on Prevention 2011).

En E.EUU, el Centro de control de enfermedades ha calculado una incidencia anual, alrededor de 1700 casos que ocasionaron 450 muertes de adulto y 100 muertes entre fetos y recién nacidos. (USA/FDA)

En Chile en el 2008 se notifica 165 casos de *Listeria monocytogenes*, en el 2009: 73 casos, en el 2010: 70 casos, en el 2011: 59 casos que fue alarmante para el país .(MSP Chile2012)

Mediante estudios realizados mostraron que la probabilidad de enfermar por la ingestión de *L.monocytogenes* era mayor en los grupos de población predispuestos que en la población general, comprobándose que la probabilidad de enfermar es diferente en los subgrupos de la población no inmunosuprimida. Basándose en información disponible sobre la vulnerabilidad de los Estados Unidos de América, se determinó que las personas mayores (60 años o más) eran 2,6 veces más propensas que la población general sana, mientras que los perinatos (fetos y recién nacidos) eran 14 veces más vulnerables, las circunstancias que debiliten el sistema inmunitario afectan también a la vulnerabilidad, en diversos grados. Estos resultados son coherentes de acuerdo a la observación fisiológica de que el riesgo de listeriosis aumenta, para una determinada dosis, conforme progresa el deterioro del sistema inmunitario de una persona. Los resultados van a depender de la distribución de *L. monocytogenes* en el alimento en el momento de su consumo ya que la bacteria no se encuentra distribuida en todo el alimento y va a depender del número de microorganismos presente para causar la infección, también depende de la frecuencia de contaminación, así como la cantidad consumida (número y tamaño de las unidades a consumir y la vulnerabilidad de la persona. (Food Safety-FAO/WHO 2004).

El crecimiento de *Listeria monocytogenes* en los alimentos depende de las características intrínsecas del alimento (pH, actividad del agua), de las características extrínsecas (temperaturas de almacenamiento, humedad relativa) y de las técnicas de procesado utilizadas en su elaboración. (Elika 2006).

De acuerdo a la información publicada en el Reglamento sobre criterios microbiológicos se puede considerar que un alimento no permite el crecimiento de *Listeria monocytogenes* si tiene las siguientes características intrínsecas: pH igual o menor a 4,4; aw es menor o igual a 0,92, debido a que son los límites inferiores para que haya crecimiento de *Listeria monocytogenes* (UE, 2005).

Listeriosis

La *Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo corto, no esporulado, es móvil a 25 °C e inmóvil a 35 °C. Es aerobio o anaerobio facultativo capaz de soportar altas concentraciones de sal y puede encontrarse normalmente en el ambiente, por ejemplo, en el suelo y en el agua de los ríos siendo un microorganismo psicótrofo que se desarrolla adecuadamente a temperaturas de refrigeración y sobrevive a condiciones ambientales más rigurosas que otros microorganismos esporulados. (Adam y Moss 2005).

Respecto a la temperatura, sus límites de crecimiento están entre 1°C y 45°C, con una temperatura óptima de 30-37°C. En cuanto al pH, es capaz de desarrollarse entre 5,1 y 9,6; pasados estos límites se inhibe su crecimiento pero puede sobrevivir. El crecimiento óptimo se produce en una atmósfera constituida por 5% de oxígeno y 5.10% de dióxido de carbono, la *L. monocytogenes* es más sensible a los ácidos que a los álcalis y puede sobrevivir a concentraciones de 25% de sal común. (Reguera y Cols 2004)

Se caracteriza por afectar el grupo de los glóbulos blancos de la sangre conocidos como monocitos. Las personas más susceptibles son las mujeres embarazadas, los ancianos, los niños y los inmunodeprimidos, no se conoce claramente la dosis infecciosa, pero se estima que en grupos sensibles, 1000 bacterias por gramo de alimento pueden ser suficientes para producir listeriosis severa y mortal.(OMS 2001).

El género *Listeria* actualmente comprende seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*, siendo potencialmente patógenas la *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* para el hombre y animales. Todas las cepas de *Listeria monocytogenes* se consideran patógenas, aunque su virulencia es variable, se reconocen 13 serovares potencialmente patógenos, de los que los más involucrados en el desarrollo de listeriosis de origen alimentario son el 4b (37-64%), 1/2b (10-35%), 1/2a (15-25%) y 1/2c (0-4%). (Elika 2006).

Patogenia

La *Listeria* tiene bajo potencial de patogenicidad, la dosis mínima infectante por vía oral no está definida y depende de la susceptibilidad del huésped.

En los pacientes, las bacterias se detectan en altas concentraciones 10⁶; En general, los niveles de *Listeria monocytogenes* en los alimentos implicados en brotes de la enfermedad son mayores de 10³ ufc/g (FDA/FSIS, 2003).

La gastroenteritis ocurre a las 24 horas post-ingesta del alimento contaminado y la enfermedad séptica se desarrolla 20 a 30 días después. (Álamo C, Rondón A. 2006). La *L. monocytogenes* tiene capacidad de invadir células epiteliales de las vellosidades intestinales y pasar rápidamente a los macrófagos del estroma adyacente. La invasión epitelial no requiere de multiplicación bacteriana local y ocurre sin lesionar la mucosa. La interacción entre infocitos y enterocitos genera producción de IL-15, citoquina importante en la defensa

local. La *listeria* viajan por vía sanguínea o linfática hasta alcanzar los 26 ganglios mesentéricos, y posteriormente, el hígado y el bazo. (Baca H, 2008)

En el hígado y el bazo, los macrófagos residentes capturan las listerias de la circulación llegando a los hepatocitos siendo el hepatocito el principal sitio de multiplicación bacteriana, donde las listerias desarrollan su ciclo biológico completo.

La respuesta celular inmune contra epítopes bacterianos específicos logra controlar y erradicar las listerias; no obstante, si la inmunidad está comprometida, es incompleta o está disminuida se produce proliferación y diseminación multisistémica de listerias con tropismo predilecto al sistema nervioso central o útero grávido, si hay gestación en curso. (Palomino V, 2006)

La invasión cerebral es consecuencia de la bacteriemia producida, las listerias invaden las células endoteliales y cruzan la barrera hematoencefálica.

A diferencia de otros gérmenes, las listerias no solo afectan las meninges, sino también el parénquima cerebral, provocando meningitis, encefalitis y abscesos.

En el útero grávido, las listerias invaden la decidua basal y las vellosidades de la placenta, forman microabscesos, vellositis focal necrotizante, y finalmente, alcanzan al feto ocasionándole compromiso multiorgánico.

La placentitis y corioamnionitis pueden conllevar al aborto espontáneo, óbito fetal o recién nacido infectado, pero la gestante casi nunca se complica con meningoencefalitis o enfermedad grave. (Baca H, 2008)

La susceptibilidad de la listeriosis durante el embarazo poco se conoce debido que la disminución de la inmunidad celular es el factor clave y la barrera materno-fetal, el factor crítico. El embarazo transcurre con depresión de la inmunidad celular (Th1 mayor que Th2), así la respuesta Th1 (regulada por IFN- γ y FNT- α), será peligrosa para el embarazo e importante contra patógenos intracelulares, está muy disminuida. (Boor K, 2006).

Manifestaciones Clínicas

La listeriosis durante el embarazo ocurre por lo común durante el tercer trimestre, la enfermedad cursa como un cuadro semejante a un gripal o de gastroenteritis febril, su evolución es benigna y casi nunca complica con sepsis o meningoencefalitis.

Los principales síntomas son fiebre, dolor de espalda, lumbalgia, dolor abdominal, náuseas-vómitos, diarreas, cefalea, mialgias y dolor de garganta, por lo que puede confundirse con resfrío común, faringitis, gastroenteritis o pielonefritis.

Los factores que determinan la sintomatología y severidad de la enfermedad son: virulencia de la cepa, tamaño del inóculo y estado de inmunidad del huésped. Los serotipos 1/2a y 1/2b de *L.monocytogenes* se relacionan con los brotes alimentarios, mientras que el serotipo 4b se asocia a enfermedad invasiva. . (Villegas, Perú 2010)

La listeriosis neonatal incluye dos manifestaciones clínicas. Una precoz de inicio temprano que ocurre durante la primera semana de producido el parto y otra de presentación tardía que ocurre después de la semana del nacimiento.

Contaminación de los Alimentos por *Listeria monocytogenes*

Los alimentos relacionados hasta el momento con brotes y casos esporádicos de listeriosis son: Carne de rumiantes, otros animales de abasto y aves, leche y derivados lácteos, pescado fresco, congelado y ahumado, frutas y verduras, huevos y ovoderivados.

Leche y derivados lácteos: En el caso de quesos elaborados con leche pasteurizada o no pasteurizada, la ausencia de *Listeria monocytogenes* depende de parámetros intrínsecos (aw, acidez, péptidos antimicrobianos, etc.) y extrínsecos (Temperatura, humedad, recontaminación, etc.), mientras su presencia es siempre problemática debido a su capacidad extraordinaria de supervivencia en condiciones hostiles. (Elika, 2006)

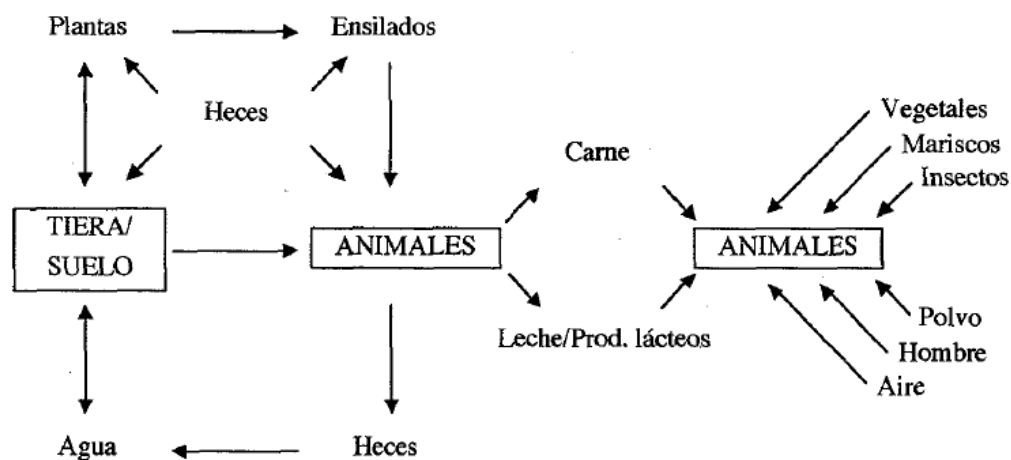


Figura N° 1. Hábitat de *Listeria monocytogenes* y vías de contaminación

Fuente: Reguera y Cols 2004.

Principios del ensayo de Kit de inmunocromatografía de flujo lateral

El sistema Reveal 2.0 para *Listeria monocytogenes*, es un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral que combina un clásico inmuno ensayo tipo "sandwich".

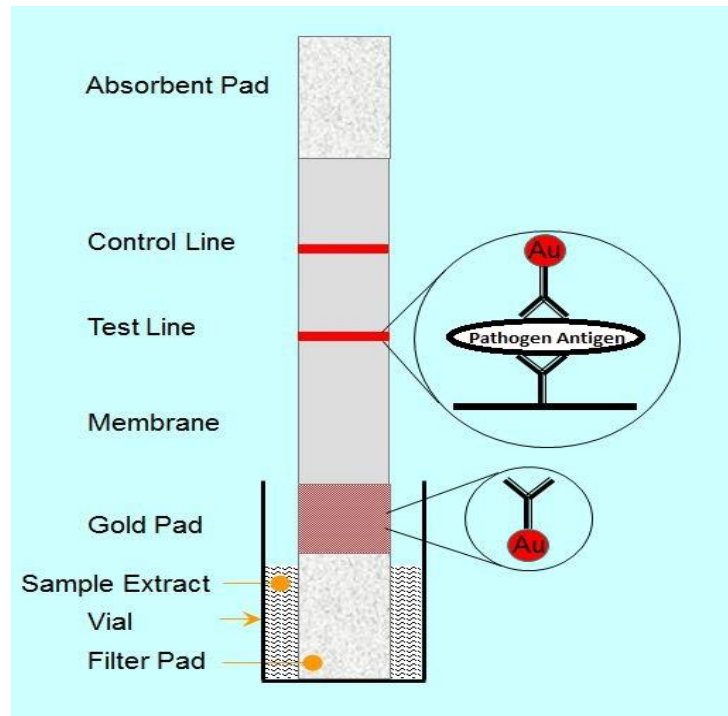


Figura N° 2: Ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral

Fuente: Ensayo Inmunocromatográfico Neogen Corporation, 2005.

El sistema está formado por un conjunto de medios de cultivo selectivos predosificados estériles (para realizar el enriquecimiento selectivo de la muestra) y una tira inmunocromatográfica en la que se realiza la detección inmunológica del patógeno. Una porción de la muestra es dispensada en la tira de detección. La muestra fluye a través de una membrana que contiene anticuerpos específicos contra el patógeno a analizar. Los anticuerpos están marcados con oro coloidal. Si el patógeno está presente, sus antígenos se unirán con los anticuerpos marcados con oro. El complejo antígeno-anticuerpo sale de la zona de reactivos y viaja a través de la membrana. La membrana contiene una zona de anticuerpos anti patógeno, los cuales capturan el complejo y muestra una línea visible con un color.

En la zona de reactivos, está presente al mismo tiempo, un inmunocomplejo de control que migra conjuntamente con la muestra dispensada. Cuando este complejo control alcanza la “zona de reacción”, se forma una segunda línea coloreada que indica que el procedimiento se ha realizado correctamente.

Una porción de la muestra enriquecida inoculada e incubada previamente se dispensa en el “pocillo de muestra” de la tira inmunocromatográfica. La muestra fluye a través de una membrana que contiene anticuerpos específicos contra el patógeno a analizar (zona de reactivos).

Estos anticuerpos están conjugados a partículas de látex de color. Si el patógeno está presente en la muestra, los anticuerpos conjugados con las partículas coloreadas se fijan a

la fracción antigénica del patógeno, formando un inmunocomplejo antígenoanticuerpo-partícula coloreada.

El inmunocomplejo migra por difusión a través de la membrana hasta una zona (zona de reacción) en la que se haya fijado un segundo anticuerpo antipatógeno específico. Este anticuerpo fijado captura el inmunocomplejo, mostrándose una línea coloreada producida por la concentración de las partículas de latex que incorpora el inmunocomplejo.

En la zona de reactivos, está presente al mismo tiempo, un inmunocomplejo de control que migra conjuntamente con la muestra dispensada. Cuando este complejo control alcanza la “zona de reacción”, se forma una segunda línea coloreada que indica que el procedimiento se ha realizado correctamente. (Neogen Corporation, 2005).

Características técnicas de Reveal *Listeria*

Según la AOAC, REVEAL 2.0 tiene las siguientes especificaciones:

Límite de detección: 1-10 UFC/25 gramos

Sensibilidad: 10^6 UFC/ML

Especificidad $\geq 99\%$

Tiempo de ejecución: Enriquecimiento: 24 a 27 horas

Test: 20 minutos

Conservación: tira de Inmunocromatográficos 2-8 °C

Medios de cultivo: temperatura ambiente

Presentación: Kit 20 test

Aprobado por: AOAC Registro RI#070601

CAPITULO I

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Localización del lugar de estudio

Para el respectivo estudio se demarco los cuatro mercados principales de la Ciudad de Cuenca, las muestras de queso fresco se tomaron en los mercados: Feria Libre, 9 de Octubre, 12 de abril y 10 de Agosto debido a que en estos mercados se expenden quesos frescos elaborados artesanalmente y son los más grandes de la Ciudad por su mayor demanda de estos productos.

1.2. Localización de los sitios de análisis de laboratorio

Los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de servicios de microbiología de la Universidad del Azuay y la validación del método de análisis, en un laboratorio certificado de la Ciudad de Guayaquil, siendo las muestras transportadas en fundas plásticas estériles y a una temperatura de 5°C

1.3. Metodología de muestreo

Para la presenta investigación se tomó un tamaño de lote de cuatro mercados de la Ciudad de Cuenca (Feria Libre, Diez de Agosto, Doce de Abril y Nueve de Octubre), de cada mercado se tomaron quince muestras, cada muestra fue aproximadamente de 300 gramos de queso. El muestreo se realizó de la siguiente manera: 2 muestras los días miércoles y 3 muestras los días sábados, se realizó el muestreo estos días debido a la mayor demanda de venta de quesos en dichos mercados, la toma se realizó cada semana y por tres semanas consecutivas realizando así para cada uno de los mercados teniendo un total de 60 muestras, la toma de las muestras se realizó en horas de la mañana siendo colocadas en bolsas plásticas y transportadas al lugar para su procesamiento.

1.4. Determinación de *Listeria monocytogenes* por inmunocromatografía

Para realizar la determinación de *Listeria* spp., se trituran la muestra recolectada y se pesa 25 gramos, los cuales se colocaron en una funda aséptica y se adicionó caldo de preenriquecimiento Fraser para *Listeria* (método oficial 2004.06 de la AOAC)

1.5. Variables del Muestro

Para el estudio se consideró un nivel de confianza del 95% y las variables que se consideraron fueron las siguientes:

Factores que impactan en el crecimiento y supervivencia de <i>Listeria monocytogenes</i>				
Factor	Puede crecer		Puede sobrevivir, pero no crecer	
	Limite inferior	Optimo	Limite superior	
Temperatura (°C)	-1,5 a + 3,0	30,0 a 37,0	45,0	-18,0
pH	4,2 a 4,3	7,0	9,4 a 9,5	3,3 a 4,2
Actividad de agua	0,90 a 0,93	0,99	>0,99	<0,90
Concentración de sal	<0,5	0,7	12 a 16	>= 20
Atmósfera	es un anarobio facultativo que puede crecer en ausencia de oxígeno, por ejemplo, envasado a vacío o atmósfera modificada			

Adaptada de (FSAL,2003)(UE,2004,2008)

1.6. Procedimiento

- Rehidratar los 7.8 gramos del medio con 100ml de agua estéril.
- Colocar las muestras en los medios rehidratados e incubar de 27 a 48 horas a 30°C+- 1°C. Remover la muestra de la incubadora, mezclar y transferir 2ml en un tubo de ensayo.
- Colocar el tubo de ensayo en baño María a 80°C por 20 minutos.
- Transferir 200 ul de la muestra preenriquecida a los pocillos del método Reveal.
- Introducir el dispositivo Reveal con flechas de muestra mirando hacia abajo en el pocillo de muestra y se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos.
- Leer los resultados después de 20 minutos, siendo positivos o negativos para cada muestra. (Anexo 2)

Determinación de Cloruro de Sodio.

Humedecer 2,5-3 g de porción de muestra en el matraz de 300 ml con una solución 0,5 M de AgNO₃ (> 5 ml en función del contenido de NaCl de producto de prueba). Añadir 15 ml de HNO₃ y se deja hervir hasta que se disuelva la muestra (10 min) luego añadir una solución de KMnO₄ en pequeñas porciones, hasta que el color desaparece la solución se vuelve casi o incolora, añadir 25 ml de H₂O y se deja hervir 5 min. Enfriar, aforar hasta 150 ml aproximadamente, añadir 25 ml de éter y leer. (JAOAC69.288_1986).

1.7. Validación de la técnica de determinación de *Listeria monocytogenes* en Quesos Frescos.

Se realizó la respectiva validación en el Laboratorio externo acreditado Laboratorio de Análisis de Alimentos S.A Avilés&Vélez AVVE de la ciudad de Guayaquil en la que se analizó una contra muestra. En cuanto a los resultados para *Listeria monocytogenes* se encuentra respaldado por los controles de calidad durante el análisis, además el método esta validado y acreditado y en el cual se detecta desde 1UFC de *Listeria monocytogenes* dicho método trabaja con el ADN de la bacteria y el método por inmunocromatografía es utilizado para la identificación presuntiva en la que se utiliza los anticuerpos del microorganismo con una Sensibilidad ≥99% y Especificidad ≥99%. El método utilizado fue

MME M20 (AOAC RI=120501) el método trabaja con el ADN de las bacterias es decir que si en la muestra existe la presencia de este microorganismo en mínima cantidad el método lo va a detectar, confirmando la validación del presente estudio. Anexo1.

CAPÍTULO II

RESULTADOS

2.1. Valores obtenidos en el estudio de *Listeria monocytogenes*

De las 60 muestras de queso fresco elaborados artesanalmente expendido en los mercados de la Ciudad de Cuenca, no se aisló la bacteria *Listeria monocytogenes*, los resultados negativos obtenidos pueden deberse a diferentes factores que limitan a la supervivencia y crecimiento de la *Listeria monocytogenes*.

Los límites para la supervivencia y multiplicación señalados en la Tabla 3 están recogidos de investigaciones realizadas en laboratorio y varían de aquellos Límites que se pueden dar en los alimentos.

De acuerdo a la tabla N° 1 se determinaron los centroides para estas variables.

Tabla N° 1: Análisis descriptivo

	Centroide 1	Centroide 2	Centroide 3	Centroide 4
Temp	23	21	20	21
pH	6.05	6.1	6,2	6,2
Acidez	2,38	2,3	2,3	2,6
Aw	0,98	0,97	0,95	0,98
NaCl%	0,59	0,61	0,59975	0,52

Fuente: Análisis de Datos CLUSTER (Tripaldi, García)

En la tabla N° 1. Se observa que la temperatura que se encuentra durante la toma de la muestra en los mercados oscila entre 20 a 23 °C, el valor de pH oscila en 5,9 a 6,2, la actividad acuosa entre 0,95 a 0,99 y cloruro de sodio entre 0,5 a 0,7% siendo las tres ultimas variables favorables para el desarrollo de la listeria según la bibliografía de (FSAL,2003)(UE,2004,2008), donde se demuestra los niveles óptimos para el crecimiento y supervivencia del patógeno.

Tabla N° 2: Análisis de Relación de Variables

Muestras	Temperatura	pH	Acidez	Aw	Cloruro de Sodio %	HieAss1
M1	23	5,9	2,36	0,99	0,6487	1
M2	23	6	2,35	0,99	0,6455	1
M3	23	5,9	2,22	0,99	0,6475	1
M4	23	5,8	2,23	0,99	0,5458	1
M5	21	6,1	2,25	0,96	0,5486	2
M6	21	6,3	2,35	0,96	0,6461	3
M7	21	6,3	2,34	0,96	0,6462	3
M8	21	6,3	2,45	0,96	0,5462	3
M9	20	6,4	2,44	0,95	0,6425	3
M10	20	6,2	2,34	0,95	0,5724	3
M11	20	6,4	2,44	0,95	0,5458	3
M12	20	5,9	2,24	0,95	0,5957	3
M13	21	6	2,26	0,98	0,7171	2
M14	21	6,1	2,25	0,98	0,7155	2
M15	20	6,2	2,26	0,98	0,6071	2
M16	23	6,2	2,46	0,98	0,5973	1
M17	22	6,2	2,45	0,98	0,5474	2
M18	22	6,2	2,36	0,98	0,5451	2
M19	21	6,2	2,26	0,98	0,5461	2
M20	20	6,2	2,36	0,98	0,5471	2
M21	20	6,2	2,46	0,98	0,6487	2
M22	21	6,2	2,45	0,98	0,6471	2
M23	23	6,2	2,46	0,98	0,5487	1
M24	21	6,2	2,36	0,98	0,6485	2
M25	20	6,2	2,26	0,98	0,5486	2
M26	20	6,2	2,36	0,98	0,6485	2
M27	23	6,2	2,36	0,98	0,5486	1
M28	21	6,2	2,26	0,98	0,5487	2
M29	21	6,2	2,36	0,98	0,5487	2
M30	21	6,2	2,34	0,98	0,6487	2
M31	21	6,2	2,36	0,98	0,6486	2
M32	21	6,2	2,26	0,98	0,6486	2
M33	21	6,2	2,25	0,98	0,5486	2
M34	21	6,2	2,36	0,98	0,5485	2
M35	21	6,2	2,22	0,98	0,5485	2
M36	21	6,2	2,21	0,98	0,6485	2
M37	21	6,2	2,24	0,98	0,5986	2
M38	21	6,2	2,23	0,98	0,6186	2
M39	21	6,2	2,24	0,98	0,5487	2
M40	21	6,2	2,26	0,98	0,6486	2
M41	21	6,2	2,25	0,98	0,6471	2
M42	21	6,2	2,33	0,98	0,5481	2
M43	21	6,2	2,34	0,98	0,6471	2
M44	21	6,2	2,33	0,98	0,6481	2
M45	21	6,2	2,31	0,98	0,6483	2
M46	21	6,2	2,32	0,98	0,6481	2
M47	21	6,2	2,3	0,98	0,6481	2
M48	21	6,2	2,33	0,98	0,5471	2
M49	21	6,2	2,29	0,98	0,6481	2
M50	21	6,2	2,28	0,98	0,6471	2
M51	21	6,2	2,3	0,98	0,6483	2
M52	21	6,2	2,61	0,98	0,5483	4
M53	21	6,2	2,61	0,98	0,5482	1
M54	21	6,2	2,61	0,98	0,6582	4
M55	21	6,2	2,61	0,98	0,5583	4

Muestras	Temperatura	pH	Acidez	Aw	Cloruro de Sodio %	HieAss1
M56	21	6,2	2,61	0,98	0,6669	4
M57	21	6,2	2,61	0,98	0,6469	4
M58	21	6,2	2,59	0,98	0,5468	4
M59	21	6,2	2,59	0,98	0,5468	4
M60	21	6,2	2,59	0,98	0,5 468	4

En tabla N° 2: Se agrupo las diferentes muestras con relación a las variables, pero se demuestra que las variables estudiadas son favorables debido a sus niveles óptimo con limites inferiores y superior para el crecimiento del patógeno, demostrando que se encuentra dentro de las condiciones para que exista presencia de *listeria monocytogenes*.

Tabla N° 3. Determinación de ausencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de queso fresco analizadas.

Mercados	Numero de muestras	Presencia o Ausencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en 25 gr muestra
Feria Libre	15	Ausencia
Nueve de Octubre	15	Ausencia
Doce de Abril	15	Ausencia
Diez de Agosto	15	Ausencia

De acuerdo a la tabla N° 3 se realiza una comparación que entre los cuatros mercados más grandes de la Ciudad de Cuenca no se aisló *listeria monocytogenes* basados en los requisitos microbiológicos de la norma INEN 1528:2012 para quesos fresco no madurados se encuentran dentro de los parámetros establecidos como en 25 gramos de muestra determina ausencia para *listeria monocytogenes*.

Tabla N° 4 Requisitos microbiológicos Norma INEN 1528:2012 para *Listeria monocytogenes* en queso fresco no madurados.

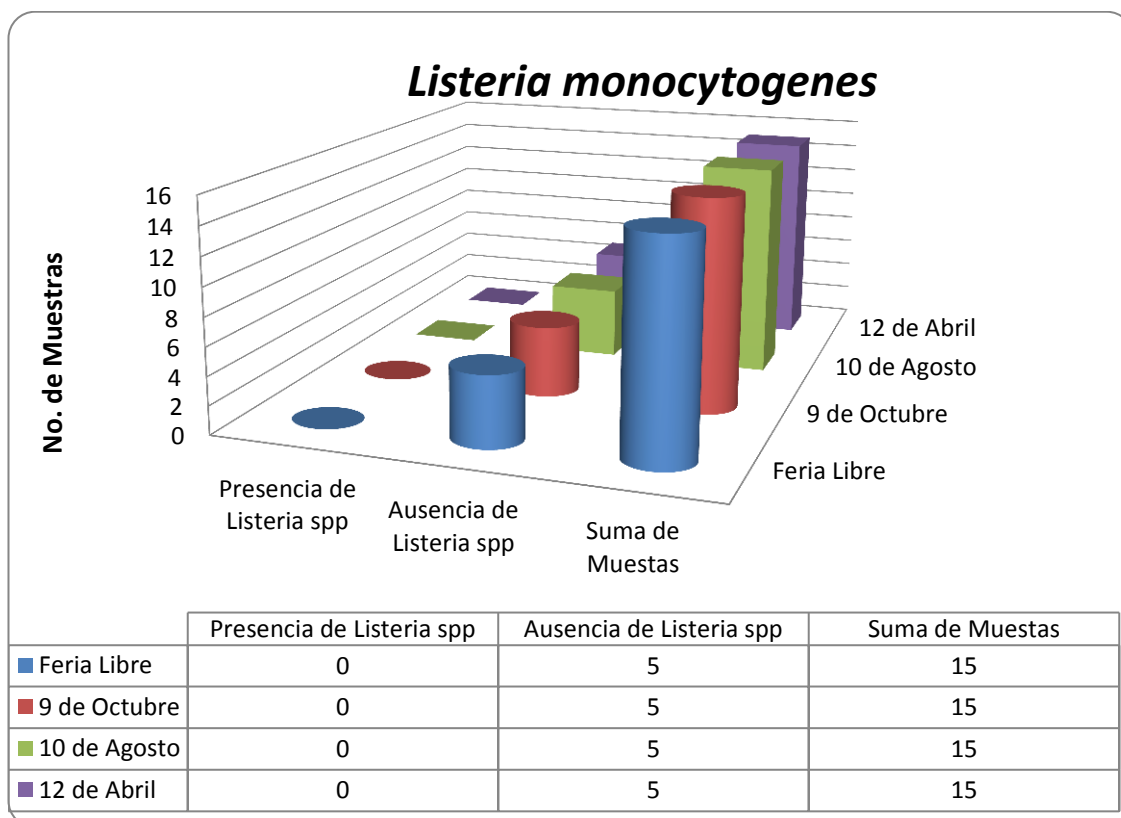
Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Enterobacteriaceas, UFC/g	5	2×10^2	10^3	1	NTE INEN 1529-13
Escherichia coli, UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991.14
Staphylococcus aureus UFC/g	5	10	10^2	1	NTE INEN 1529-14
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	ausencia	-		ISO 11290-1
Salmonella en 25g	5	AUSENCIA	-	0	NTE INEN 1529-15

Tabla N° 5 Validación de la muestra de queso realizado por el método Reveal 2.0 en el laboratorio certificado AVVE de la ciudad de Guayaquil.

Laboratorio	Método	Presencia-ausencia de <i>Listeria monocytogenes</i>
Universidad del Azuay	Reveal 2.0 para listeria spp.	Ausencia
AVVE-Guayaquil Laboratorio Certificado.	PCR, para listeria monocytogenes	Ausencia

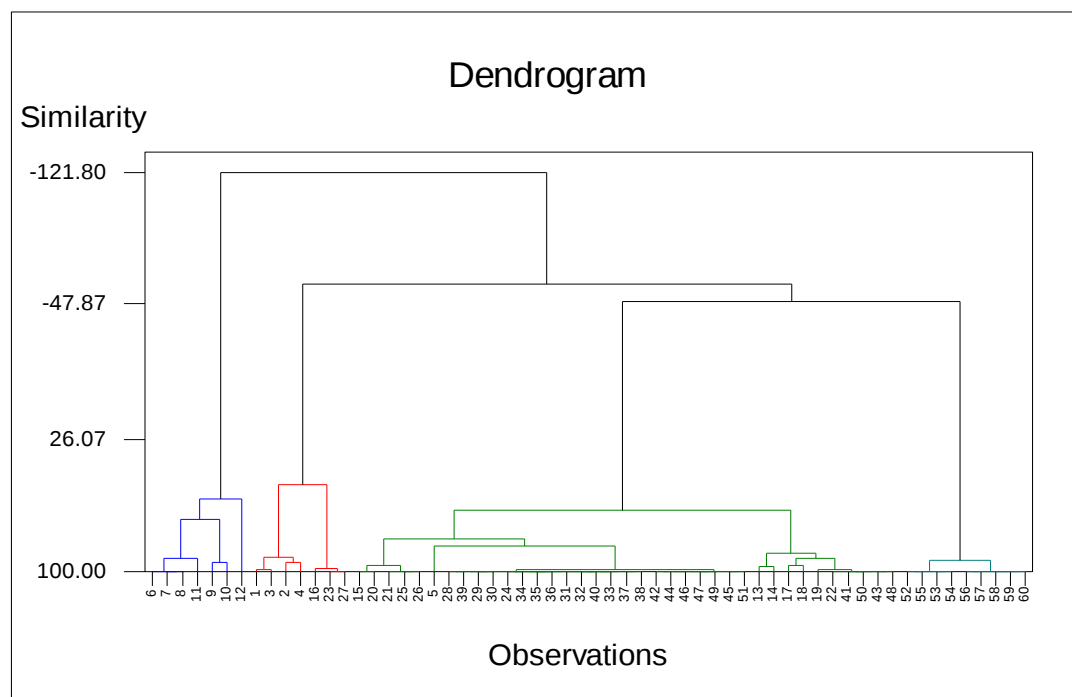
Tabla N° 5. Se realiza una comparación de validación a través del Ensayo inmunocromatografico por el método Reveal 2.0 y por reacción de la cadena de polimerasa dicho método que trabaja con el ADN de la bacteria, la cual valida que el método utilizado en el presente trabajo garantiza el estudio, siendo ausencia por los dos métodos Los dos Métodos analizados toman de referencia a la Norma INEN 1528:2012

GRAFICA N° 1: Resultados de determinación de *Listeria monocytogenes* en muestras de queso frescos expendido en los mercados de la ciudad de Cuenca.



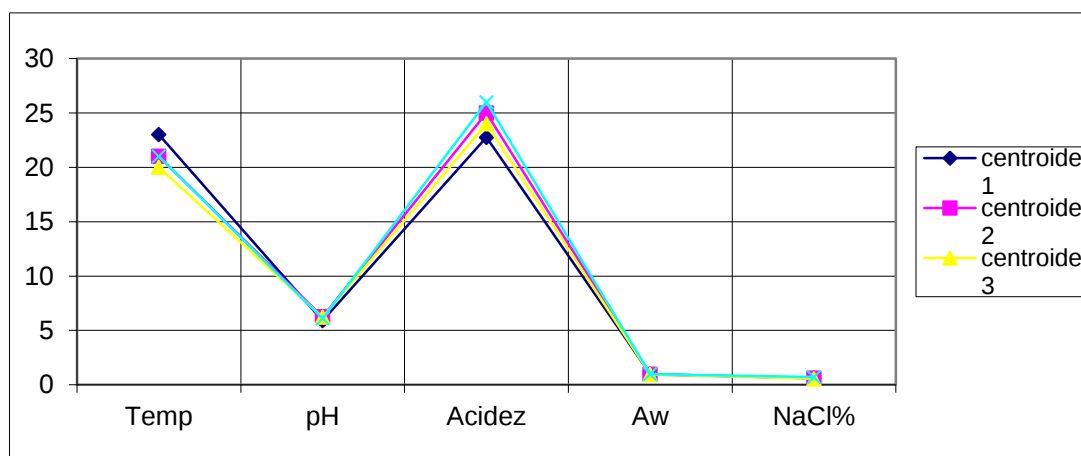
En la gráfica N° 1 se demuestra que de los cuatro mercados muestreados y de las cinco repeticiones con un total de sesenta muestras se obtiene un valor cero para la presencia y ausencia de *Listeria monocytogenes* en la suma total de las sesenta muestras.

GRAFICA N° 2: Resultados de determinación de *Listeria monocytogenes* dependiente de los factores intrínsecos y extrínsecos.



De acuerdo a la Gráfica N° 2 los resultados obtenidos en el análisis para las sesenta muestras de queso se basa en la agrupación de los datos que se asemejan obteniendo una similitud entre las muestras analizadas y demostrando que las variables son fundamentales para el crecimiento de la bacteria.

GRAFICA N° 3: Determinación de variables para la supervivencia y crecimiento de *listeria monocitógenes*



En la Gráfica N° 3 se demuestra que de las cuatro variables para la supervivencia y crecimiento de *Listeria monocytogenes*, se encuentran dentro de los límites establecidos por la (FSAL,2003)(UE,2004,2008), excepto la temperatura donde los valores obtenidos se encuentra entre 20 y 23°C siendo su temperatura optima 30 a 37°C y su límite inferior 27°C. En cuanto a las variables cloruro de sodio, actividad acuosa y pH se encuentran dentro de los límites inferiores por lo cual no se descarta la posibilidad de crecimiento de listeria.

CAPÍTULO III

DISCUSIÓN

El estudio realizado en la determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos elaborados artesanalmente expendidos en los mercados de la ciudad de Cuenca, demostró ausencia para listeria siendo un alimento listo para consumir sin su debido procesamiento industrial.

La Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SIVE) 2013, reporta que se obtuvieron en la provincia del Azuay 268 casos por intoxicaciones alimentarias siendo el grupo afectado comprendidos entre la edad de 20 a 49 años, pudiendo en algún momento ser parte de estos datos estadísticos una intoxicación alimentaria por *Listeria monocytogenes*.

Se han reportado casos en los último años de *L. monocytogenes* en Chile en el año 2012 y 2013 y en España en el 2012 y en Estados Unidos en el 2011, como patógeno transmitido por alimentos, y aunque da origen a una enfermedad poco documentada y estudiada en nuestro país, es una amenaza para la salud pública debido a su alta tasa de mortalidad.

En Ecuador en el año 2009 se registra un caso de aborto espontáneo en el hospital "Roberto Albert Gilbert Lizalde" de la ciudad de Guayaquil, donde los estudios correspondientes demostraron aislamiento de *listeria monocytogenes*. (Rev Médica, 2009)

En un estudio realizado en la evaluación de riesgos de *L.monocytogenes* en alimentos listos para el consumo publicado por la FAO/ OMS 2004, no hay datos relativos a la relación entre dosis y respuesta obtenidos en estudios con voluntarios expuestos a *L. monocytogenes*, ni tampoco en estudios realizados con un patógeno substitutivo. Por consiguiente, se han desarrollado y evaluado relaciones entre dosis y respuesta basándose en consultas a expertos, datos epidemiológicos o de estudios con animales.

Los niveles de *Listeria monocytogenes* en los alimentos implicados en brotes de la enfermedad son mayores de 103UFC/g (FDA/FSIS, 2003).

Los principales factores limitantes en la supervivencia y multiplicación de *Listeria monocytogenes* en los alimentos son la temperatura, pH, la aw y cloruro de sodio, la tolerancia de listeria es mayor cuando todas las condiciones son óptimas para su crecimiento, teniendo limites inferiores y superiores que limitan su crecimiento.

Siendo la temperatura ideal para la multiplicación entre 30-37°C a pH neutro o ligeramente alcalino. Sin embargo, puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración < 5 °C.

Para que la bacteria produzca la enfermedad va a depender de la cantidad y frecuencia del

consumo del alimento es decir tamaño, número de porciones consumidas, teniendo en cuenta que cada célula microbiana actúa de forma independiente y que una sola célula es capaz de provocar la *listeriosis*, dependiendo de la vulnerabilidad de la persona con inmunodeficiencia, personas mayores, y perinatos que en una población general.

En un estudio realizado en Estados Unidos de América, se determinó que las personas mayores (60 años o más) eran 2,6 veces más vulnerables que la población general sana, mientras que los perinatos (fetos y recién nacidos) eran 14 veces más vulnerables.

La probabilidad de enfermar por el consumo de un número especificado de *L. monocytogenes* puede representarse por factores, como la cadena alimentaria, la virulencia de la cepa y la vulnerabilidad del consumidor, todos los casos de *listeriosis* se originan por el consumo de concentraciones altas del patógeno.

De acuerdo a la investigación de listeria los valores para que causen la enfermedad pudieron estar por debajo de los niveles para causar *listeriosis*.

No se garantiza que las muestras analizadas tuvieron una buena manipulación, almacenamiento, también entra en correlación los factores (intrínsecos y extrínsecos) para el crecimiento y la supervivencia de la bacteria.

CONCLUSIONES

- No se evidenció la presencia de *Listeria monocytogenes* en 60 muestras de quesos frescos elaborados artesanalmente, analizadas en cuatro mercados de la Ciudad de Cuenca. Sin embargo no se descarta la posibilidad de la existencia de otros microorganismos que puedan afectar a la salud del consumidor.
- Se determinó que todos los productos elaborados artesanalmente o industrialmente deberían tener un objetivo general de seguridad alimentaria que será el de establecer la ausencia de *Listeria monocytogenes* en los alimentos procesados y el de no permitir su presencia por encima de 100 ufc/g en el momento de consumo del alimento.
- Se determinó que el método de inmunogromatografía mediante el kit Reveal 2.0 para determinación de *Listeria* en alimentos con una sensibilidad y especificidad $\geq 99\%$, siendo un kit efectivo, confiable y optimiza tiempo.
- Se podría mejorar mediante El Ministerio de Salud pública si se redujera la frecuencia de estos casos de contaminación en la elaboración, manipulación y venta al por menor de los alimentos que no contienen las respectivas buenas prácticas de fabricación.
- Para determinar confiabilidad del método del estudio se envió analizar una contramuestra de queso fresco en un laboratorio externo certificado.
- Se debe realizar estudios en quesos fresco elaborados artesanalmente *Echerichia coli*, *S aureus* y *salmonella* debido a que son patógenos que deben ser controlados porque pueden causar una enfermedad de transmisión alimentaria de acuerdo a la norma INEN 1528: 2012 para queso fresco.
- Los criterios microbiológicos para el crecimiento de *listeria monocytogenes* están relacionados de acuerdo con las variables cuantitativas, donde la temperatura en este estudio no se encuentra dentro de los niveles óptimos y que las variables: actividad acuosa, pH y cloruros de sodio se encuentran dentro de los límites inferiores pudiendo haber crecimiento para listeria.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

CODEX. Alimentarium CAC/GL 61 - 2007. Enmiendas a las normas y a los textos afines del CODEX.

INEN, (2012). Norma Técnica Ecuatoriana NTE-INEN 1528-2012 .Quesos Frescos No Madurados y Requisitos. Primera revisión 2012-03. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito-Ecuador.

Gray M, Freitag N, Boor K. How the listerial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde. Infect Immun 47-52, 2006.

Palomino VMuerte fetal por listeria: Reporte de un caso. VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. 12-16, 2006..

Adams y Moss, Microbiología de los Alimentos. Acribia S.A. Zaragoza; España 2005, pag 234-239.

Caballero, Angel E, Higiene de los Alimentos.Ciencias Médicas; La Habana 2008, pag 50-53.

Forsythe y Hayes. Higiene de los Alimentos Microbiología y HACCP. Acribia S.A. Zaragoza; España 2006, pag 53-58

Madigan, Martinko y Parker, Biología de los Microorganismos, décima Edición 2009; pag. 953-954.

Ángel Caballero. Higiene de los Alimentos; Ciencias Médicas, Habana 2008, pag 219-230-232.

Reguera y Colsdocumento científico, Área de Microbiología. Facultad de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Burgos. Área de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid 23-29, 2004.

Álamo C, Rondón 2006 A. Meningoencefalitis por *Listeria monocytogenes*. Peediatrica 2006; 8: 39-42.

Baca H, Lam J, Piña F, *Listeriosis* en gestantes. Lima-Perú. Rev Per Obst Enf USMP 2008; 4: 2-6.

George w, Latimer Jr, Official Methods of Analysis, AOAC, edition 2012, chapter 39, p.4.

REFERENCIAS ELECTRONICAS

FDA/FSIS (2001) (U.S. Food and Drug Administration/USDA Food Safety and Inspection Agency) Draft assessment of the relative risk to public health from foodborne L. monocytogenes among selected categories of ready-to-eat foods. Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) and Food Safety Inspection Service (FSIS-USDA).

URL: <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisk.html> [Consultado el 01 de enero de 2013].

MSP (2013). Gaceta Epidemiológica Ecuador SIVE-Alerta 2013. Gaceta SEMANAS EPIDEMIOLÓGICAS Disponible en:

<http://www.salud.gob.ec/gaceta-epidemiologica-ecuador-sive-alerta-2013/>

Neogen Corporation, 2005. Neogen, Reveal and GENE-TRAK are registered trademarks and GeneQuence and ISO-GRID are trademarks of Neogen Corporation, Lansing, MI 48912. 800/234-5333 (USA /Canada) foodsafety@neogen.com • www.neogen.com

Fana J., Boscan L. (1992). "Detección de adulteración de leche con suero mediante la relación proteína sérica/caseinato". (En línea). Zulia, Venezuela.

URL: <http://revistas.luz.edu.ve/index.php/rc/article/viewFile/5137/4986> [Consultado el 9 de mayo 2012].

Espinoza Ana M; Torre de la Magali 2000; SALINAS Marianella: Laboratorio de Microbiología, Centro Nacional de Alimentación y Nutrición, Instituto Nacional de Salud; Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" Ica, Perú.

URL: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172646342004000200003&script=sci_arttext [Consultado el 21 de diciembre de 2012].

Guía de Cumplimiento de Política, Guía FDA, Sec. 555.320 *Listeria monocytogenes*

URL: http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm136694.htm?utm_campaign=Google2&utm_source=fdaSearch&utm_medium=website&utm_term=listeria%20monocytogenes&utm_content=1 [Consultado el 16 de Abril de 2013].

CODEX ALIMENTARIUS CAC/GL 61 – 2007 prevención de *listeriosis* en mujeres embarazadas en Estados Unidos.

URL: http://www.fda.gov/downloads/Food/ResourcesForYou/HealthEducators/UCM106974.pdf?utm_campaign=Google2&utm_source=fdaSearch&utm_medium=website&utm_term=determinacion%20de%20listeria%20monocytogenes%20en%20queso&utm_content=2 [Consultado el 19 de mayo de 2013].

FAO/OMS 2004 Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo.

URL:ftp://ftp.fao.org/es/esn/jemra/mra4_es.pdf [Consultado el 06 de junio de 2013].

Elika, 2006 Fundación Vasca para la seguridad Agroalimentaria. *Listeria monocytogenes*. Pág.4 de 13945 122 170. berri@elika.net

URL:<http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo21/Listeria.pdf> [Consultado el 09 de agosto de 2013].

ANEXOS

ANEXO 1: Resultados de validación del método realizado en laboratorio externo AVVE del análisis de la contra muestra de queso fresco recogida en los mercados de la Ciudad de Cuenca.




INFORME DE ENSAYOS

Fecha de Informe:	26/Abr/2013	Orden:	3201	Nº de Informe:	2381-13	Página:	1/1
-------------------	-------------	--------	------	----------------	---------	---------	-----

INFORMACION DEL CLIENTE:							
Nombre:	RITA GARCIA						
Dirección:	RICAURTE CALLE 1ERA.						
Teléfono:	0984864986	Fax:	--	E. Mail:	--		

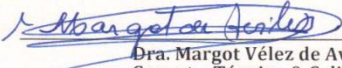
DATOS DE LA MUESTRA:							
Tipo de Muestra:	LECHE Y DERIVADOS						
Nombre:	QUESO						
Descripción:	Queso						
Lote:	--	Fecha de Elab.	--	Fecha de Exp.	--		
Contenido:	Declarado: --	Encontrado:	1 de 122 g	Condición:	Normales, funda plástica		
				Forma de conservación:	Refrigeración 5°C		
Fecha de Recepción:	19/Abr/2013	Cód. de Laboratorio:	PL-C-141-19-04-13	Muestreo:	Realizado por el cliente		

RESULTADOS					
Fecha de Análisis:	22/Abr/13	Libro / Página:	K37-510:	14/1/24	
Condiciones Ambientales:		Temperatura:	18°C - 25°C	Humedad relativa:	40% - 55%
Parámetros	Unidad	Resultados	**Requisitos	Método de Referencia	
Listeria Monocytogenes	/25g	No Detectado	No Detectado	MME M20 AOAC RI# 120501	

**Requisito Microbiológico establecido según Norma INEN 1528 para Queso.

CONCLUSIÓN
La muestra analizada CUMPLE con el requisito Microbiológico establecido según Norma INEN 1528 para Queso.

OBSERVACIONES
Se podrán solicitar modificaciones de documentos hasta 6 meses después de su emisión. La contra muestra se almacena en el laboratorio por 1 Mes. Prohibida su reproducción total o parcial, sin previa autorización de LABORATORIOS AVVE S.A. Los registros generados por el análisis de la(s) muestra(s) son mantenidas en los archivos del laboratorio por 5 años Las observaciones y opiniones no se encuentran dentro del Alcance de Acreditación <i>Válido solo el informe original</i>



Dra. Margot Vélez de Avilés
Gerente Técnico & Calidad

Anexo 2: Procedimiento mediante el método de Reveal 2.0

Reveal 2.0 for *Listeria* Procedure

Environmental Samples



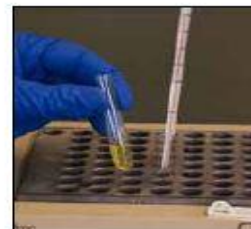
1. Rehydrate 7.8 g LESS media with 100 mL of sterile water.



2. Place environmental sample in rehydrated media and incubate 27–48 hours at $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.



3. Remove sample from incubator, mix well and transfer approximately 2 mL into small glass tube.



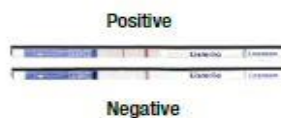
4. Place the glass tube in a water bath or heater block at 80°C for 20 minutes.



5. Transfer 200 μL of heat-killed, enriched sample to the Reveal sample cups.



6. Place Reveal device with sample arrows facing down into sample cup and incubate at ambient temperature for 20 minutes.



7. Read and record results after 20 minutes.