DEPARTAMENTO DE POSGRADOS

MAESTRÍA EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

"*Investigación de microorganismos patógenos en Salchicha tipo Frankfurt que se expenden en el mercado EL ARENAL de la cuidad de Cuenca*."

TRABAJO DE GRADUACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO "MAGISTER EN GESTIÓN DE LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

AUTOR: MARTHA ALEJANDRO BECERRA.

DIRECTOR: MGST. MARIA FERNANDA ROSALES MEDINA

CUENCA ECUADOR

2014

DEDICATORIA

A Dios por darme la salud y fortaleza para culminar con éxito una meta más en mi vida.

A mi esposo Ricardo, por su paciencia, comprensión y apoyo.

A mis dos luceros Richard y Dennis, por su amor y ternura.

AGRADECIMIENTO

A la Mgst. María Fernanda Rosales (Directora de tesis y Jefa de Laboratorio de Alimentos de la Universidad del Azuay), por su sabiduría, experiencia y amistad sincera, por guiarme en lo académico y poder culminar este trabajo de manera satisfactoria.

A mi compañera y amiga la Dra. Nancy Vanegas siempre presta a despejar todas mis dudas para la realización de este trabajo.

Y a todas las amistades, familiares que siempre me colaborar de manera incondicional.

Resumen

Al constituir, la salchicha Frankfurt un producto listo para el consumo y utilizarse como bocados en reuniones familiares y sociales sin previo tratamiento térmico (someter a cocción), se planteó determinar la presencia de *Listeria spp*, *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella spp.*, según normativa INEN NTE 1338, las mismas que en las cantidades establecidas garantizan el tiempo de vida útil del producto así como la inocuidad del mismo al consumidor. Se analiza 3 marcas de salchicha Frankfurt, de 12 puestos del mercado de distribución El Arenal de la ciudad de Cuenca, se tomaron 72 muestras de los productos expendidos en las carnicerías del mercado. Se aplicaron técnicas microbiológicas modernas aprobadas por la AOAC, como: inmunocromatografía (Reveal) para Listeria y Salmonella, detección en placa (Compact Dry) y pruebas bioquímicas miniaturizadas GN id A y B para Escherichia coli y Staphylococcus aureus, además de las pruebas confirmatorias mediante el Software MID 60. Se determinó con estas pruebas que varias de las muestras se encuentran contaminadas con bacterias patógenas que pueden ser un riesgo para el consumidor.

PALABRAS CLAVE:
Salchicha, Listeria, Salmonella, inmunocromatografía, pruebas bioquímicas

ABSTRACT

Due to the fact that Frankfurt sausages, a ready-to-eat and commonly used snack product, are consumed without heat treatment (cooked), we consider important to determine the presence of Listeria spp, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, and Salmonella spp according to the INEN NTE 1338 Ecuadorian Technical Norm. The presence of these in specified quantities guarantees the shelf life of the product and its safety to the consumer. 3 brand-names of Frankfurt sausages from 12 market stalls at *El Arenal* distribution in Cuenca were analyzed. 72 samples of the products sold at the market butchers were taken. Modern microbiological techniques approved by the AOAC (**Association of Official Analytical Chemists**) as immunochromatographic Reveal test for Listeria and Salmonella, Compact Dry Detection Board and GD id A y B miniaturized biochemical tests as well as Software (MID 60) confirmatory testing for Escherichia coli and Staphylococcus aureus were applied . It was determined from these tests that various samples are contaminated with pathogenic bacteria and can be a risk to the consumer.

KEYWORDS: Sausage, Listeria, Salmonella, Immunochromatography, Biochemical Tests

UNIVERSIDAD DEL AZUAY
DPTO. IDIOMAS

Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

INDICE DEL CONTENIDO

CONTENIDO: Pág.
DEDICATORIA…….. ……i
AGRADECIMIENTO……...ii
RESUMEN……...iii
ABSTRACT AND KEYWORDS.....iv
INDICE DE CONTENIDO……...v
INDICE DE FIGURAS……vi
ÍNDICE DE TABLAS…….....vi

INTRODUCCIÓN……1
MÉTODO REVEAL PARA LISTERIA SPP……. ……..3
COMPACT DRY EC…… 3
COMPACT DRY XSA…..……...4
HIPÓTESIS NULA…….....4
HIPÓTESIS ALTERNATIVA…….4
OBJETIVO GENERAL……...4
OBJETIVOS ESPECIFICOS…….4
CAPITUL0 I……..6
MATERIALES Y MÉTODOS…..……6
1.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO ……..6
1.2 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS..……..6
1.2.1PREPARACIÓN DE LAS MUESTRA Y ANÁLISIS PARA IDENTIFICACIÓN DE SALMONELLA…….…9
1.2.2 PROCEDIMIENTO…….9
1.3 IDENTIFICACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y ESCHERICHA COLI POR MÉTODO DE COMPACT DRY……..……..……..10
1.3.1 PROCEDIMIENTO……..…10
1.4 IDENTIFICACIÓN DE LISTERIA SPP., MÉTODO DE REVEAL LISTERIA……..10
1.4.1 PROCEDIMIENTO……..……....10
CAPITULO II……..11
RESULTADOS……...11
CAPITULO III……..19
DISCUSIÓN……...19
CONCLUSIONES……..22
BIBLIOGRAFÍA…….…….23
REFERENCIAS ELECTRÓNICAS……..…24

ANEXOS……25

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- MUESTRAS PRESUNTIVAS DE SALMONELLA…..…….....11
FIGURA 2.- FRECUENCIA DE ENTEROBACTERIAS ANALIZADAS…..……....12
FIGURA 3.- PORCENTAJE DE ENTEROBACTERIAS ENCONTRADAS EN MUESTRAS DE SALCHICHA FRANKFURT……..…13
FIGURA 4.- MÉTODO SOFTWARE MID 60.PORCENTAJE DE PROBABILIDAD DE MICROORGANISMOS ENCONTRADOS……13
FIGURA 5.- CRECIMIENTO EN LOG DE ESCHERICHIA COLI……14
FIGURA 6.- CRECIMIENTO LOG DE COLIFORMES FECALES……..15
FIGURA 7.- PORCENTAJE DE PRESENCIA DE S AUREUS EN LAS MUESTRAS DE SALCHICHA FRANKFURT ANALIZADAS……..…16
FIGURA 8.- PORCENTAJE DE MICROORGANISMOS ENCONTRADOS DURANTE EL ANÁLISIS……..…… 16
FIGURA 9.- PORCENTAJE DE MICROORGANISMOS POSITIVOS PRESUNTIVOS PARA SALMONELLA SPP…….……..17
FIGURA 10.- MARCAS A, B, C DE SALCHICHA FRANKFURT CONTAMINADAS……18

INDICE DE TABLA

Tabla 1. Resultado de Pruebas Bioquímicas Presuntivas de Salmonella…….....12

Alejandro Becerra Martha Alexandra.
Trabajo de Graduación.
Ing. María Fernanda Rosales.
Enero, 2015.

"Investigación de microorganismos patógenos en Salchicha tipo Frankfurt que se expenden en el mercado EL ARENAL de la cuidad de Cuenca."

INTRODUCCIÓN:

Las enfermedades transmitidas por los alimentos de origen microbiano, por virus y parásitos, son causadas por ingerir alimento y agua contaminada, o sus toxinas. La contaminación de los alimentos puede ser endógenas, o bien ocurrir en algún punto de su transformación. Por tanto el agente etiológico debe existir en los animales, vegetales o medio ambiente donde se almacena, procesa o maneja el alimento.

Generalmente los microorganismos contaminan los alimentos en pequeñas cantidades y deben encontrar en ellas las condiciones adecuadas para sobrevivir y multiplicarse hasta alcanzar los niveles necesarios para ser infectados o producir la suficiente toxina para causar la enfermedad. (Doyle, et al, 2001)

En el Ecuador según la Gaceta Epidemiológica (SIVE) de la semana 16 del periodo 2014 (Ver Anexo I) se han reportado 1169 casos confirmados de infecciones por Salmonella, 1003 casos de Fiebre tifoidea y paratifoidea, así como 3879 de intoxicaciones alimentarias agudas sólo lo que va en este año.

Además se observa que Azuay es la séptima provincia que presenta el mayor número de casos de Salmonella (Ver Anexo II).

De acuerdo a estos reportes, las toxiinfecciones pueden ser provocadas por alimentos que se consumen generalmente, de consumo inmediato dentro de los cuales pueden estar las salchichas tipo Frankfurt que pese a que son alimentos cocidos son expendidas al granel y pueden venir contaminadas desde la fábrica o contaminarse en el expendio.

La salchicha tipo Frankfurt es la mezcla de ingredientes/carne, denominada habitualmente como emulsión cárnica, se embute en tripas naturales o artificiales que se giran y ligan para obtener una tira de salchichas enlazadas. Las salchichas se someten a una cocción típica a una temperatura interna de ≥70°C con el fin de coagular las proteínas, fijar el color curado y destruir ciertos microorganismos patógenos y bacterias alterantes. Tras la cocción, se enfrían, se envasan y se refrigeran y se distribuyen para su venta al por mayor y menor (ICMSF, 2002)

Existiendo parámetros establecidos por la Norma INEN NTE 1338:2010 (Carne y productos cárnicos. Productos cárnicos crudos, productos cárnicos curados-madurados y productos cárnicos precocidos-cocidos). Y de esta manera garantizar la inocuidad del producto terminado al consumidor. (Ver Anexo III).

Los microorganismos, sobre todo los patógenos, producen las conocidas enfermedades transmitidas por los alimentos (*ETAs)* que afecta a toda la población, ocasionando pérdidas económicas, falta laboral, pérdida de trabajo y hasta la muerte, sobre todo en individuos inmunocomprometidos.
Como se indicaba, las ETA(s) pueden deberse a diversos microorganismos patógenos tales como:

-*Listeria spp.*- Es un microorganismo Gram-positivo, anaerobio facultativo, catalasa positiva y oxidasa positiva, crece a intervalos de amplia temperatura que va desde 0°C a 42°C con un crecimiento óptimo entre 30°C y 37°C, su pH de crecimiento está entre 5,6 y 4,4.La mayor parte de las infecciones en animales son subclínicas, pero la *Listeriosis* puede producirse esporádicamente o de forma epidémica. La infección puede deberse al contacto directo con animales infectados, especialmente durante el parto de las vacas o las ovejas sin embargo, estas infecciones son muy raras. La importancia relativa de la transmisión zoonóticas de la enfermedad al hombre no está clara, y aparentemente es más relevante para la Salud Pública la contaminación a partir del ambiente en el que se procesan los alimentos (Adams y Moss 2005).

-*Escherichia coli*.- Es un bacilo Gram-negativo, temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, crece a un pH neutro aunque se ha visto su crecimiento a pH inferiores a 4,4, catalasa-positivo, oxidasa negativo. Al ser un habitante casi universal del intestino de las personas y de los animales de sangre caliente donde es el anaerobio facultativo predominante. Su presencia nos indica contaminación fecal, por ende una mala manipulación, pude desencadenar enfermedades como sepsis, infecciones de las vías urinarias, neumonías en enfermos con bajas defensas y meningitis en recién nacidos (Adams y Moss 2005).

- *Staphylococcus aureus*.- Es un coco Gram- Positivo catalasa positiva, oxidasa negativa anaerobio facultativo, es un mesófilo típico con un intervalo de temperatura de crecimiento entre 7 y 48 °C y una temperatura óptima de 35-40°C con un pH de crecimiento de 6-7.

El hábitat principal de esta bacteria, es la piel, glándulas anexas y las mucosas de los animales de sangre caliente, así como, en las personas en el tracto nasal en el que se encuentran entre el 20-50% de los individuos sanos. Se puede aislar en las heces y, esporádicamente del medio ambiente así como el suelo, agua de mar, el agua dulce, etc. La intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus,* producirá, nausea, vómito, espasmo de

estómago, diarrea. En casos graves, es posible que la deshidratación, la palidez y el colapso requieran un tratamiento por infusión intravenosa (Adams y Moss, 2005).

- *Salmonella spp*.- Son bacilos Gram-negativos, catalasa positiva, oxidasa negativa su temperatura de crecimiento oscila entre 5° a 47°C siendo su temperatura óptima a 37°C, su pH va en torno a 7. La mayoría de salmonellas son consideradas patógenos para el hombre, aunque difiere en cuanto a las características y gravedad de la enfermedad que causan. La fiebre tifoidea es la más grave y consiguientemente fue la primera infección por salmonellas que fue descrita de modo fiable. Las *salmonellas* son responsables de varios síntomas clínicos diferentes que aquí se agrupan bajo los epígrafes enteritis y enfermedad sistémica (Adams y Moss, 2005).

Existe dentro del grupo de las *Enterobacteriaceae, otros microorganismos que provocan enfermedades, aunque no están descritas normalmente dentro de las ETAs.*

Para poder determinar el tipo de microorganismo que pueda estar presente en el alimento y causar una toxiinfección al consumidor, tenemos diferentes técnicas, entre ellas las de la nueva era de la microbiología rápida:

Método Reveal para *Listeria spp*: El Sistema Reveal® es un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral que combina un clásico inmunoensayo tipo “sándwich” con la tecnología cromatogràfica para la detección rápida y precisa, en un solo paso, a microrganismos patógenos en alimentos, materias primas y piensos para animales.

La tirilla contiene una membrana integrada por anticuerpos para *Listeria spp.* marcados con oro coloidal. Si el microorganismo está presente se da la unión antígeno-anticuerpo, los anticuerpos presentes en la membrana 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.
Este método aprobado por la AOAC, con una sensibilidad 10^6 UFC/ML, con límite de detección: 1-10 UFC/25 gramos y especificidad de ≥99%(Neogen, Reveal 2005)

Para la cuantificación de Microorganismos *Coliformes Totales, Eschericha coli, Staphylococcus aureus,* se utiliza el método Compact dry, probado por la AOAC.

Compact Dry EC permite la detección y diferenciación entre coliformes totales y *E. coli*. El medio contiene dos sustratos enzimáticos cromógenos: Magenta-GAL y X-Gluc De esta

manera los coliformes totales desarrollan una coloración roja, mientras que la de los *E. coli* es azul (Ver Anexo IV). (Hy Serve, 2013).

Compact Dry XSA es una placa cromogénica lista para usar para el recuento total de gérmenes *Staphylococcus aureus*, utilizando como medio especifico manitol deshidratado. (Hy Serve, 2013).

Microgen ™ GN ID PANEL A y PANEL B.- Son Pruebas confirmatorias para *Salmonella spp*. basadas en pruebas bioquímicas aprobadas por la AOAC
Consiste en 12 sustratos tanto para GN A Y GEN B que identifica los organismos más comunes de *Enterobacteriaceae como: Acinetobacter spp, Morganella spp, Eschericha coli, Citrobacter spp., Shigella spp. Edwardsiella spp, Salmonella spp., Providencia spp, Yersinia spp.,Serraia spp., Hafnia spp., Proteus spp.*

En conclusión se trata de un sistema de identificación que contiene 24 sustratos, consiste en 2 paneles A y B, capaz de identificar 139 organismos en la base de datos MID 60. (Ver Anexo V). (Microgen Bioproductos, 2013)

Hipótesis nula:
Existe contaminación de microorganismos patógenos en las salchichas tipo Frankfurt que se expenden en el mercado el Arenal de la ciudad de Cuenca.

Hipótesis alternativa:
No existe una contaminación por patógenos en las salchichas tipo Frankfurt que se expenden en el mercado El Arenal de la ciudad de Cuenca.

Objetivo General:

Determinar la presencia de microorganismos patógenos, bajo la norma INEN 1338, así como la *Listeria spp.* en salchicha tipo Frankfurt, expendida en mercado EL ARENAL de la Cuidad de Cuenca.

Objetivos Específico:

- Determinar a través de análisis microbiológicos la presencia de los microorganismos patógenos de acuerdo a la norma INEN NTE 1338.
- Tabular los datos obtenidos y realizar un análisis estadístico del número de muestras para determinar la prevalencia o no de estos patógenos en los diferentes puestos del mercado EL ARENAL.

- Comprobar a través del análisis microbiológico de las salchichas y de la revisión visual de los puestos del mercado si la probable contaminación proviene debido a la mala manipulación y falta de refrigeración.

CAPITULO I.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1.1 Localización del Estudio:

El sitio de estudio se realizó en el mercado el Arenal de la ciudad de Cuenca tomando las muestras de salchicha tipo Frankfurt en diferentes días y en diferente puesto de mercado en los meses de octubre, noviembre, diciembre 2013.

1.2 Recolección de las muestras:

Debido a que se plantea una hipótesis nula y otra alternativa, se debe realizar un muestreo que determine claramente cuál de las dos hipótesis es cierta, basándose en la Teoría Estadística de la Decisión.(Spiegel et al, 2009)

Mediante información obtenida de la administración del Mercado El Arenal existen 87 puestos distribuidos en tres plataformas. Para este estudio se tomó una plataforma que implica 19 puestos, pero al revisar ya, en campo se pudo observar que sólo 12 puestos de estos tienen las tres marcas a estudiar, obteniéndose 36 muestras, por duplicado. Para la investigación se usó el método de Muestreo Aleatorio Simple (M.A.S.) sin reposición ya que es un método sencillo que se puede aplicar cuando se conoce el número de la población total (Martínez, C. 2000).

Una muestra aleatoria simple de tamaño N es una muestra de n unidades seleccionadas de tal manera que cada muestra posible de tamaño n tiene la misma probabilidad de ser seleccionada (Martínez, C. 2000).

Probabilidad

Definición Clásica.- Suponga que un evento *E* puede ocurrir en *h* de *n* manera igualmente posible. Entonces la probabilidad que ocurra el evento (a la que se llama éxito) se donota como:

$$p = \Pr\{E\} = \frac{h}{n}$$

(Spiegel et al 2009)

La probabilidad de que no ocurra el evento (a la que se llama *fracaso*) se denota como:

$$q = \Pr\{\text{no } E\} = \frac{n-h}{n} = 1 - \frac{h}{n} = 1 - p = 1 - \Pr\{E\}$$

Por lo tanto, $p + q = 1$ o bien $\Pr\{E\} + \Pr\{\text{no } E\} = 1$. El evento "no E" suele denotarse $\bar{E}$, $\tilde{E}$ o bien $\sim E$.

(Spiegel et al 2009)

Obsérvese que la probabilidad de un evento es un número entre 0 y 1. Si el evento no puede ocurrir, su probabilidad es 0. En cambio, si se trata de un evento que tiene que ocurrir (es decir, que es seguro que ocurra), su probabilidad es 1. Si p es la probabilidad de que ocurra un evento, las posibilidades u oportunidades a favor de su ocurrencia son p : q (que se lee "p a q"); las posibilidades en contra de que ocurra son q : p. Por lo tanto, las posibilidades en contra de que en un solo lanzamiento de un dado caiga un 3 o un 4 son q : p = 2 3 : 1 3 = 2:1 (es decir, 2 a 1).

PROBABILIDAD CONDICIONAL; EVENTOS INDEPENDIENTES Y DEPENDIENTES

Si E1 y E2 son dos eventos, la probabilidad de que ocurra E2, dado que E1 ha ocurrido, se denota Pr{E2|E1} o Pr{E2 dado E1} y se conoce como la probabilidad condicional de E2 dado que E1 ha ocurrido. Si la ocurrencia o no ocurrencia de E1 no afecta la probabilidad de ocurrencia de E2, entonces Pr{E2|E1} = Pr{E2} y se dice que E1 y E2 son eventos independientes, de lo contrario se dice que son eventos dependientes.

Si se denota con E1E2 el evento de que "tanto E1 como E2 ocurran", evento al que suele llamarse evento compuesto, entonces:

$$\Pr\{E_1E_2\} = \Pr\{E_1\}\Pr\{E_2|E_1\}$$

(Spiegel et al 2009)

En particular:

$$\Pr\{E_1E_2\} = \Pr\{E_1\}\Pr\{E_2\} \quad \text{para eventos independientes}$$

(Spiegel et al 2009)

Para tres eventos E1, E2 y E3, tenemos:

$$\Pr\{E_1E_2E_3\} = \Pr\{E_1\}\Pr\{E_2|E_1\}\Pr\{E_3|E_1E_2\}$$

(Spiegel et al 2009)

Es decir, la probabilidad de que ocurra E1, E2 y E3 es igual a (la probabilidad de E1) × (la probabilidad de E2 dado que E1 ha ocurrido) × (la probabilidad de E3 dado que E1 y E2 han ocurrido). En particular,

$$\Pr\{E_1 E_2 E_3\} = \Pr\{E_1\} \Pr\{E_2\} \Pr\{E_3\} \quad \text{para eventos independientes}$$

En general, si E1, E2, E3, . . . , En son n eventos independientes que tienen probabilidades p1, p2, p3, . . . , pn, entonces la probabilidad de que ocurra E1 y E2 y E3 y . . . En es p1p2p3 . . . pn. (Spiegel et al 2009).

El Nivel de significancia.- Cundo se comprueba determinada hipótesis a la probabilidad máxima con la que se está dispuesto a cometer un error tipo I se llama nivel de significancia de la prueba. Esta probabilidad acostumbra a denotarse α y por lo general se especifica antes de tomar cualquier muestra para evitar que los resultados obtenidos influyan sobre el valor de elección de esta probabilidad. (Spiegel et al 2009)

Para este caso de determinó un nivel de significancia del 5% y un nivel de confianza del 95%. Lo cual significa que existen 5 posibilidades en 100 de que se rechace una hipótesis que debería ser aceptada.

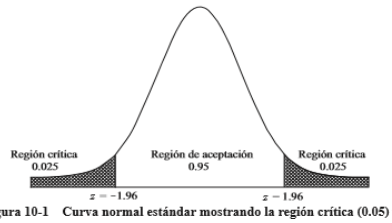


Figura 10-1 Curva normal estándar mostrando la región crítica (0.05) y la región de aceptación (0.95).

Fuente: Spiegel M. y Stephens L. 2009

El tamaño de la muestra se determina por la fórmula:

$$n_o = \frac{z^2 S^2}{\delta^2}$$

(Martínez C. 2000)

En donde:

n_o = tamaño de la muestra

S= varianza para el estudio se considera 0.5 porque existe un 50% de probabilidad de que el puesto cumpla con la norma y el 50% de que no cumpla.

δ = error de muestreo considerando un 5% para el estudio.

z = nivel de confianza obtenido de tablas si z=1.96 el nivel de confianza es 95%

Sustituyendo valores en la fórmula tenemos que n_o= 384,16

Con este dato calculamos el número de muestras usando la fórmula:

$$n = \frac{no}{1 + \frac{no}{N}}$$

(Martínez C. 2000)

En donde

Población: N 12 (puestos del mercado que venden las tres marcas de salchichas)

Muestra: n 11,63 que aproximando seria 12 puestos en los que se tomarían las muestras y en cada uno las tres marcas elegidas para el muestreo.

Total de muestras a seleccionar de los puestos del mercado, son 36 y se toman por duplicado, lo cual da un total de 72 muestras para realizar el estudio.

Para poder realizar el estudio se adquirió aproximadamente 250 gramos de salchichas de cada marca y de cada puesto del mercado. Las muestras fueron debidamente refrigeradas y se trasladó al laboratorio de Microbiología de la Universidad del Azuay.

1.2 .1 Preparación de las Muestra y análisis para identificación de Salmonella.

1.2. 2 Procedimiento

En un mesón de laboratorio debidamente limpio y desinfectado, cerca de un mechero de alcohol encendido, se corta la muestra con un cuchillo esterilizado y se pesa 25 gramos en una balanza técnica (marca OHAUS), una vez picada la muestra se coloca en 225 ml de Caldo lactosado debidamente esterilizado (Autoclave ALL AMERICAN) se incuba (Incubadora MEMMERT) por 24 horas a 37°C.

Del cultivo listo, se pasa 0.1 ml a Caldo Tetrationato (Merck), se incuba a 42°C (Incubadora ESCO) por 16-20 horas, posteriormente se siembra por estría en agar SS (MERCK) y en agar Cromocult (MERCK). Este proceso se realiza en la cámara de flujo laminar vertical (marca ESCO), debidamente higienizada y desinfectada. Las placas de agar SS y Cromocult previamente inoculadas se incuban a 37°C (incubadora MEMMERT) por 24 horas, luego de lo cual se observó la existencia de colonias negras en agar SS y colonias turquesas en agar Cromocult (siendo positivo presuntivo para *Salmonella*), además en agar Cromocult se detectaron colonias rosadas, indicativo de la presencia de coliformes fecales. Al observar la existencia de colonias positivas se procedió a tomar las colonias negras y sembrarlas en agar nutritivo, e incuba a 37°C por 24 horas, seguido se tomó una colonia para realizar prueba de oxidasa (todas las muestras positivas en agar SS y Cromocult, dieron negativo a esta prueba). Estas bacterias fueron analizadas luego a través de pruebas bioquímicas (Microgen™ GN ID PANEL A Y PANEL B), para esto se colocaron en 3ml de

solución salina estéril una colonia de bacteria presuntiva; luego se toma 2-3 gotas de este cultivo, se vierte en los pocillos, adicionar aceite mineral (sólo en los pocillos señalados), se deja a temperatura de 34-37°C por 24 horas, luego en los pocillos señalados se colocan los reactivos VP I y VPII, Indol y Kovas´c. Para las prueba GN ID panel A se incuba a temperatura de 37°C por 24 horas y para la prueba en el panel B, se incuba por 48 horas. Al finalizar el tiempo de incubación se realiza la lectura en la tabla de colores, obteniéndose códigos, los cuales son necesarios para la lectura en el software MID 6.0, con el cual se obtiene el nombre de la bacteria.(Ver Anexo V).

1.3 Identificación de *Staphylococcus Aureus y Eschericha Coli* por método de Compact Dry.

1.3.1 Procedimiento:

Previa limpieza y desinfección del área de trabajo en presencia de un mechero encendido, se corta con el cuchillo esterilizado la muestra de salchicha Frankfurt, se pesa 10 gr. en una balanza técnica, se coloca en una bolsa ziplock estéril y se adiciona 90 cc de agua peptonada estéril. Realizar diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-3}, mediante vertido colocar 1 ml de cada dilución en las cajas Compact Dry para *Staphylococcus aureus* y para *E. coli/ Coliformes,* incubar a 37 °C por 48 horas y 24 horas respectivamente. Posteriormente realizar el contaje. (Ver Anexo IV).

1.4 Identificación de *Listeria spp.,* Método de Reveal *Listeria.*

Método validado por la AOAC.

1.4.1. Procedimiento

Este método, consiste en:

- Rehidratar el contenido de vial (Half Fraser) con 200 ml de agua estéril en la bolsa estéril, colocar 25 g (Balanza marca OHAUS) de salchicha Frankfurt incubamos a 30°C+-1 (Incubadora MEMMERT) durante 27 a.48 horas,
- Se coloca 2 ml de esta mezcla en un tubo de ensayo, incubar a 80°C (Baño maría) durante 20 minutos.
- Extraer 200ul del líquido y colocar en un pocillo, introducir la tirilla y dejar por 20 minutos a temperatura ambiente, para observar la aparición de líneas, una negativa y dos positivo. (Ver Anexo VI).(Neogen, Reveal 2005).

CAPITULO II.

RESULTADOS

Una vez realizados los análisis respectivos en las muestras recolectadas, se determinó el grado de contaminación de los diferentes microorganismos analizados.

En la tabla 1, (Ver Anexo VII) se observa que los resultados de Salmonella en la mayoría de las muestras de salchicha dieron negativo en los medios de cultivo utilizados (agar SS y Cromocult), sin embargo se presentaron resultados positivos, que determinaba presuntivos de Salmonella, los cuales debían de investigarse para su confirmación.

A continuación se identifica claramente las muestras que resultaron presuntamente positivas y las negativas para *Salmonella spp*.

# de Muestras presuntivas positivas	12
# de Muestras Presuntivas negativas	60

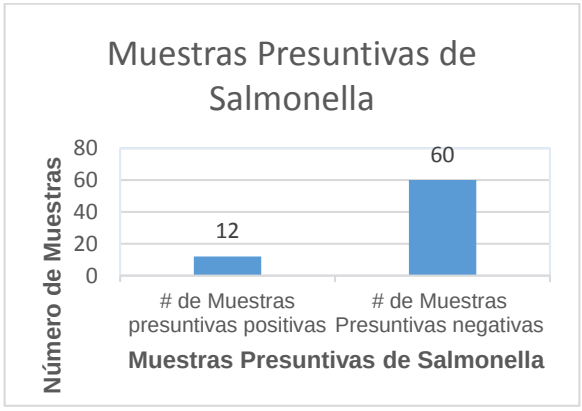


Figura 1.- Muestras Presuntivas de Salmonella

La confirmación de las muestras positivas, se realizó con las baterías de pruebas bioquímicas MICROGEN GN ID panel A y panel B, las cuales dieron como resultado que los microorganismos presuntivos de *Salmonella spp*, en realidad se trataban de las bacterias

descritas en la Tabla 2, por lo tanto *Salmonella spp*. se descartó, aunque las bacterias encontradas pertenecen en su mayoría a la familia de las *Enterobacterias.*

Tabla 1. Resultado de Pruebas Bioquímicas Presuntivas de Salmonella.

Muestra	**Código Software**	**Microorganismo**	**% de probabilidad**
20131023 A	00210301	Providencia rustigianii	99.42
20131104 A	00210404	Shigella serogrupo A,B,C	61.09
20131104 C	00000061	Acinobacter lwoffii	50.23
20131111 C	00212025	Shigella serogrupo A,B,C	99.38
20131113 B	00210001	Providencia rustigianii	86.55
20131123 B	00250001	Providencia rustigianii	86.51
20131123 C	00210001	Providencia rustigianii	86.55
20131125 A	00212001	Providencia rustigianii	82.38
20131125 B	00210001	Providencia rustigianii	86.55
20131129 B	00000061	Acinetobacter lwoffii	50.23
20131204 A	00210404	Shigella serogrupo A,B,C	61.09
20131213 C	00210404	Shigella serogrupo A,B,C	61.09

Dentro de las enterobacterias que con mayor frecuencia se encontraron se observan detalladamente a continuación**:**

Microorganismo	**Frecuencia**
Providencia rustigianii	6
Shigella serogrupo A,B,C	4
Acinobacter lwoffii	2

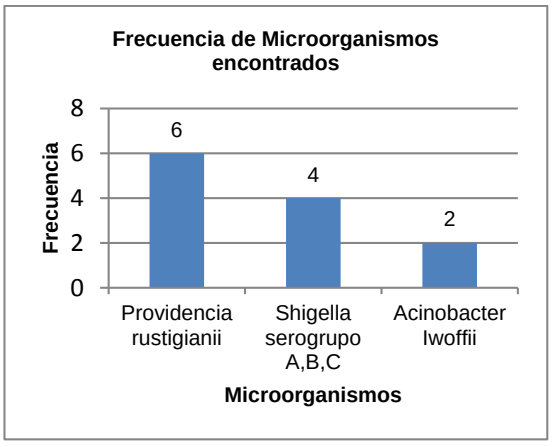


Figura 2.- Frecuencia de Enterobacterias analizadas.

Expresado en porcentajes tenemos:

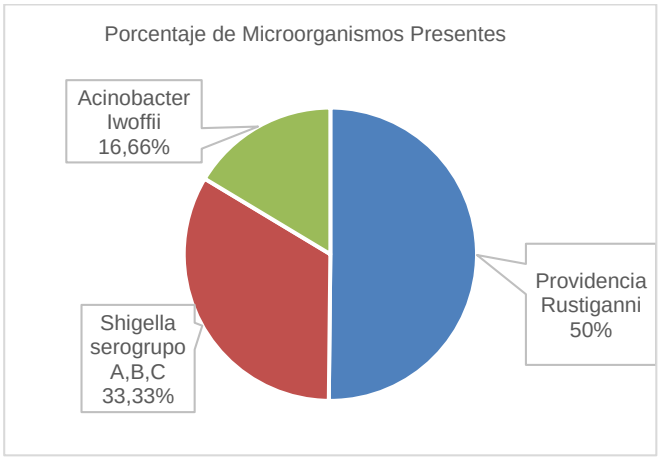


Figura 3.- Porcentaje de Enterobacterias encontradas en muestras de Salchicha Frankfurt.

De acuerdo a las pruebas bioquímicas el porcentaje de probabilidad de que sea el microrganismo descrito arriba y que lo determina el software MID 60 se muestran en la figura 4.

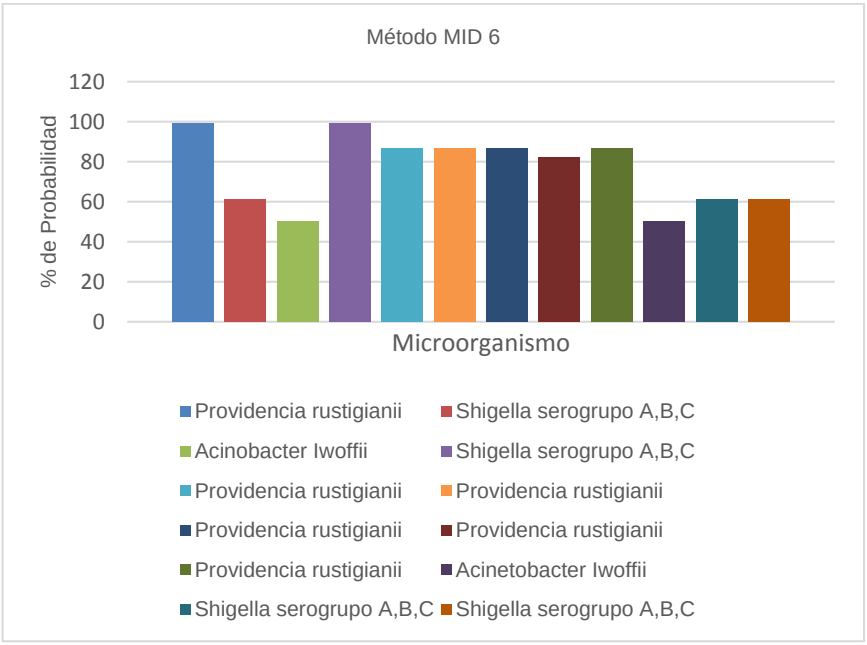


Figura 4.- Método Software MID 60.Porcentaje de Probabilidad de Microorganismos encontrados

En la tabla 3 (Ver Anexo VIII) se obtuvo que los resultados de *E coli/Coliformes*, sembrados en compact dry EC, la gran parte de muestras analizadas dio como resultado <1 log (cero

crecimiento), considerando que pocas muestras están fuera de los rangos estipulados por la Norma NTE 1338 para carnes. Los análisis de *E coli/ Coliformes* se realizaron en una técnica diferente a la dictaminada en la norma INEN NTE 1338, ya que esta indica el método del NMP/g (número más probable por gramo) en la que <3log es indicativo de cero bacterias. Todas aquellas muestras que están < 1 log, están exentas de bacterias. Los resultados en Compact dry dieron colonias de color azul para E. coli y púrpuras para Coliformes fecales. (Ver anexo TABLA IV).

Al analizar los resultados obtenidos y colocados de una manera resumida podemos observar que son pocos los valores que están por encima de la NORMA INEN NTE 1338 donde su valor normal es de <3 que en valor logarítmico sería menor 0.47 log, como se detalla a continuación.

Muestras	Crecimiento log de Eschericha Coli
20131021A	5,5
20131023C	1,07
20131118A	2,69
20131125A	3,6
20131125B	3,95
20131125C	4,3
20131202A	2
20131209B	2,6

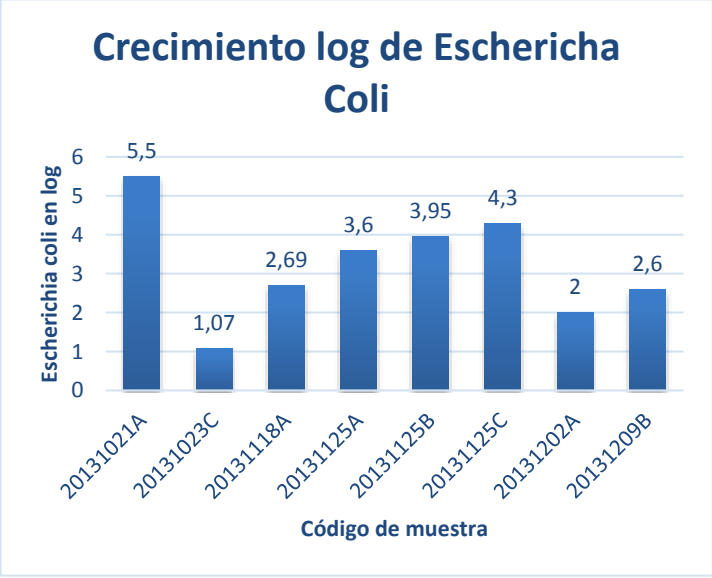


Figura 5.- Crecimiento en log de Escherichia Coli

Un indicativo de contaminación son los Coliformes totales, los cuales se encontraron en tres muestras analizadas. Aunque en la norma técnica ecuatoriana no se analiza Coliformes totales, se los toma en cuenta en este estudio ya que son indicativo de contaminación fecal.

Muestras	Crecimiento log de Coliformes totales
20131030A	2,47
20131030B	2,9
20131030C	2,84

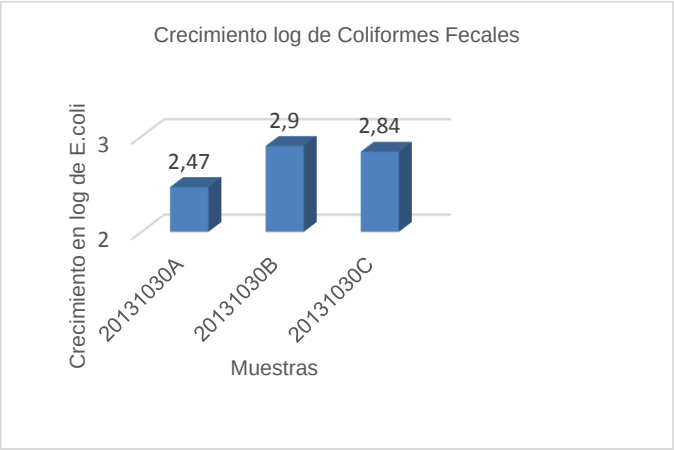


Figura 6.- Crecimiento log de Coliformes Fecales

Al obtener los resultados de las muestras de salchicha Frankfurt, estudiados en Compact dry XSA para Staphylococcus aureus todos los valores obtenidos se encuentran bajo los valores determinados por la norma INEN NTE1338 ($1.0X10^4$ o 4 log)

En la gran mayoría de muestras no hubo crecimiento de Staphylococcus Aureus, pero se observó que la única que presentó crecimiento el valor se encuentra dentro de lo que estipula la norma INEN NTE 1338 $1.0X10^4$ para Staphylococcus aureus (4 log).

Expresado en porcentajes del total de las muestras que dieron crecimiento y las que no, se tiene la siguiente figura:

Microorganismo	Presencia
Muestras con presencia de S Aureus	1,38%
Muestras sin presencia de S Aureus	98,60%

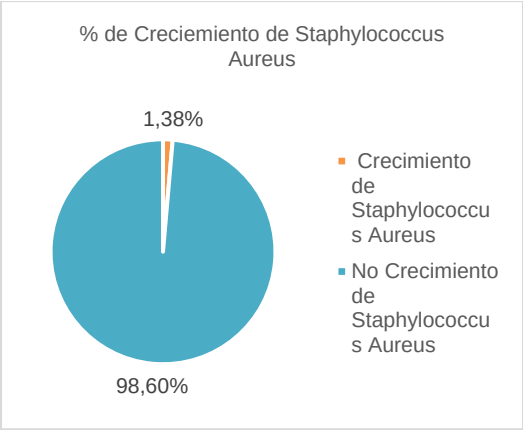


Figura 7.- Porcentaje de presencia de S. Aureus en las muestras de salchicha Frankfurt analizadas.

Los resultados de análisis de *Listeria spp.*, en pruebas cualitativas de Reveal Listeria dieron negativos indicando ausencia tal como lo indica en la Norma INEN 1338.

Al término de este estudio se pudo establecer el porcentaje de cada uno de los microorganismos encontrados, dando una visión general, de contaminación de la salchicha Frankfurt.

	Microorganismos	**Porcentaje**
	Positivos Presuntivos de Salmonella spp.	16,67%
	Escherichia coli	11,12%
	Coliformes fecales	4,17%
	Staphylococcus aureus	1,40%
Total de microorganismos encontrados		33,36%
Muestras Negativas		66,64%

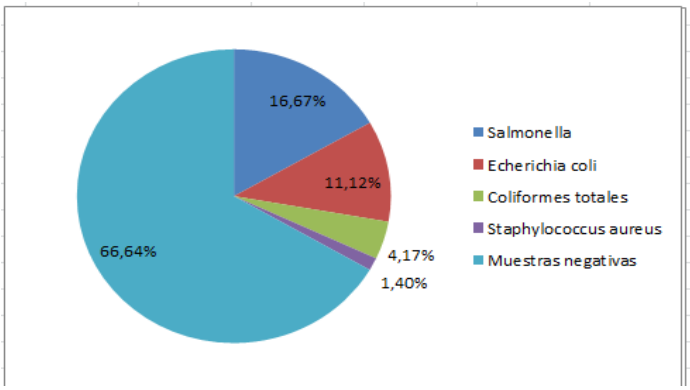


Figura 8.- Porcentaje de Microorganismos encontrados durante el análisis

Dentro de las bacterias presuntivas positivas de *Salmonella spp*.,(12 muestras) correspondientes al 16,67% y una vez realizados los análisis correspondientes de identificación bioquímica, se encontraron tres enterobacterias, de las cuales dos de ellas poco comunes como: *Providencia rustigianii (6 muestras)* en un 8,33%, *Acinetobacter iwoffi* (2 muestras) en un 2,77%, y otra enterobacteria más común y más patogénica que fue *Shigella Serogrupo A, B, C* (4 muestras) en un 5.5%. Aunque el porcentaje de contaminación es bajo sigue siendo un riesgo para la salud de la población.

Positivos presuntivos de Salmonella spp.	**Porcentaje**
Providencia rustigianii	8,33%
Shigella serogrupo A,B,C	5,50%
Acinetobacter iwoffii	2,77%

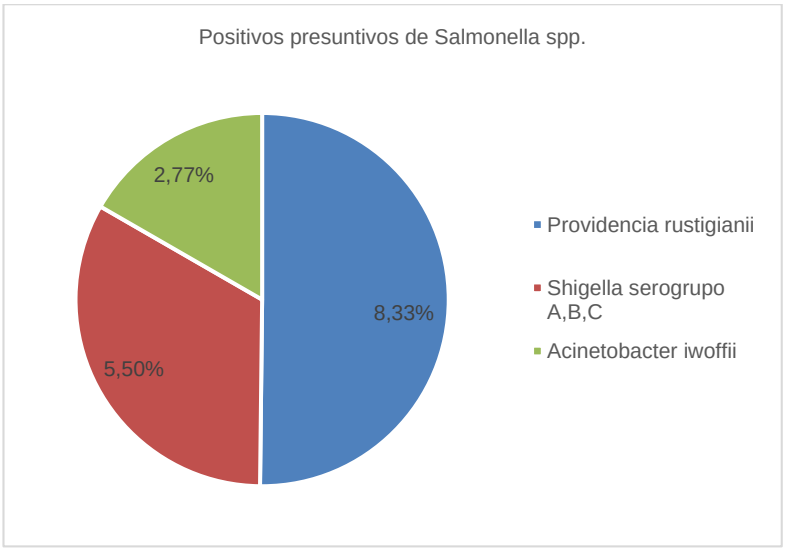


Figura 9.- Porcentaje de microorganismos positivos presuntivos para Salmonella spp.

Al término de este estudio se establece que en las tres marcas estudiadas A,B,C, se encontraron los microorganismos analizados, como se evidencia en las figuras 9.

Como resultados generales se puede identificar, que las diferentes marcas analizadas, presentaron las siguientes contaminaciones.

Marca A: Se identificaron las bacterias: Providencia Rustigianii, Shigella Serogrupo A,B,C; Echerichia Coli, Coliformes totales, Staphylococcus Aureus.

Marca B: Se identificaron las bacterias: Providencia Rustigianii, Acinetobacter, Echerichia Coli, Coliformes totales.

Marca C: Se identificaron las bacterias: Providencia Rustigianii, Shigella Serogrupo A,B,C; Acinetobacter, Echerichia Coli, Coliformes totales.

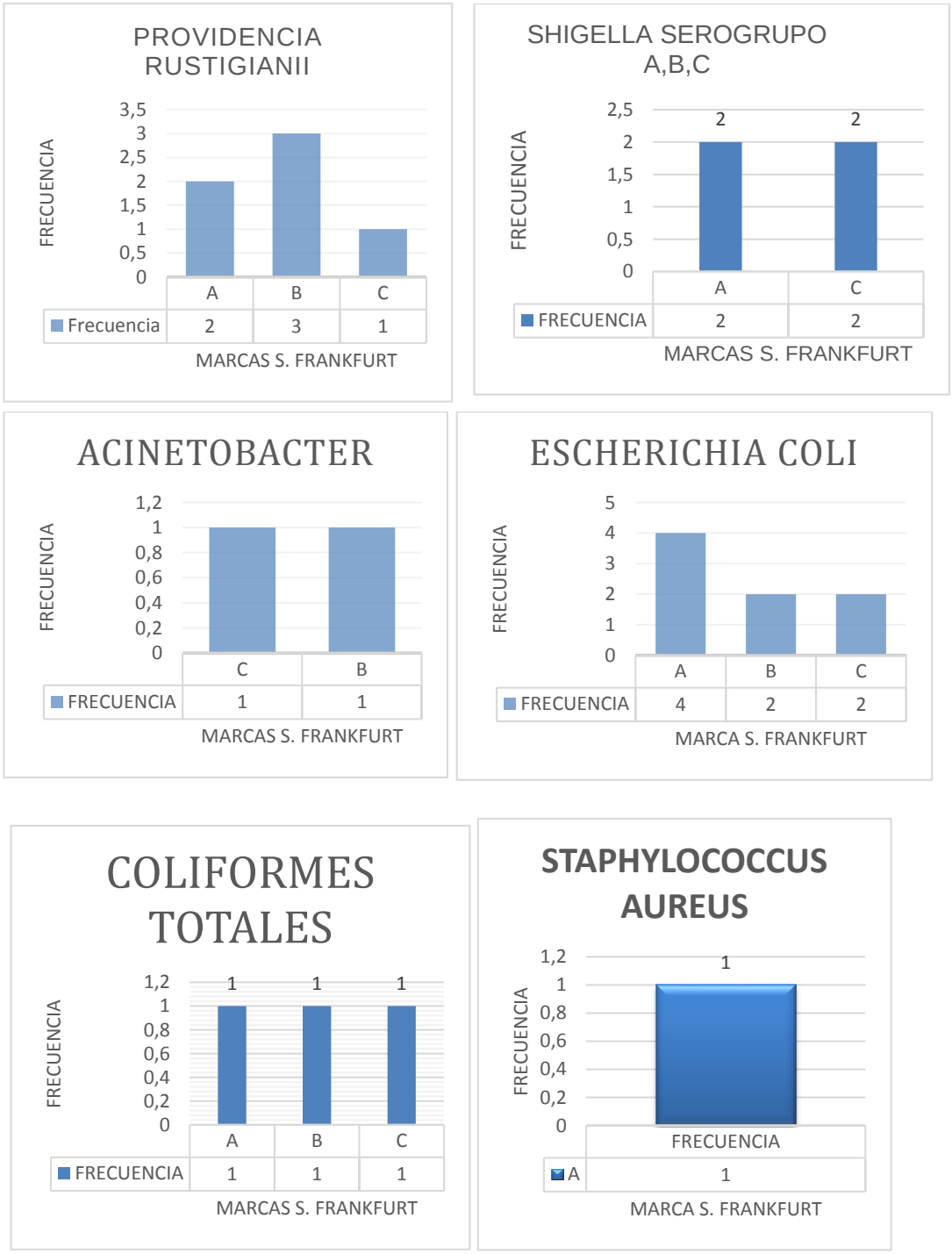


Figura 10.- Marcas A, B, C de Salchicha Frankfurt contaminadas.

CAPÍTULO III.

DISCUSIÓN.

Al realizar el análisis se tomó en consideración las marcas existentes, principalmente las de mayor distribución en el mercado de salchichas, las 3 marcas A(Italiana), B(Europea), C (Cuencanita), 72 muestras en total en 12 puestos del mercado El Arenal, se observa mayoritariamente que se cumple con la NORMA NTE INEN 1338. Los parámetros utilizados para el estudio fueron: identificación de *Salmonella spp*, *Listeria spp*. contaje total de *Staphylococcus aureus*, recuento de *Coliformes* totales y *Escherichia coli*.

Todas las bacterias antes mencionadas tienen su temperatura óptima de desarrollo entre 30-37°C; el momento de muestreo se encontró una temperatura ambiente de 11-14°C (hora 7:00 am.), temperatura no tan propicia para su crecimiento.

De las 72 muestras analizadas, todas dieron negativas para *Listeria spp*., utilizando método de Reveal, es un método cualitativo de inmunocromatografía de flujo lateral, que nos permite detectar la presencia o ausencia de *Listeria spp* en las muestras.

Así mismo para la investigación de *Salmonella spp.* de las 72 muestras, las 60 no presentaron desarrollo en el agar SS, en tanto que las 12 restantes resultaron positivas presuntivas para *Salmonella spp*.(Figura 1). En las pruebas confirmatorias MICROGEN GN A y GN B el resultado fue de otras *Enterobacteriaceaes* tales como: *Providencia rustigianii, Shigella serogrupo A,B,C; Acinetobacter iwoffii,* lo cual expresado en porcentajes es *Providencia rustigianii* se encontró en un 50%, *Shigella serogrupo A,B,C* en un 34% y *Acinetobacter iwoffii* en un 16.% (Figura 2-3).

Para establecer el tipo de microorganismo analizado se utilizó el software MID 60, el cuál mediante el código obtenido de las pruebas bioquímicas, determina el porcentaje de probabilidad de la bacteria encontrada. Se observa en la Figura 4, que en la muestra código 20131023A la probabilidad de que la bacteria presente sea *Providencia rustigianii* es de un 99,42%, en la muestra código 20131111 el porcentaje de probabilidad para *Shigella serogrupo A, B, C* es de 99,38%, y en la muestra código 20131129B, en la que menos precisión se encontró fue del 50,23% de probabilidad para *Acinetobacter iwoffi.*

Tanto *Providencia rustigianii* como *Acinetobacter iwoffi* son microorganismo que crecen en el suelo y las aguas estancadas (Koneman y et. 2006), de donde muy probablemente se contaminen los productos, en las bandejas donde se encuentran las salchichas junto con la carne de pollo, chancho, res y vísceras. Se suma a esto la falta de refrigeración, ya que se encuentran colgadas a temperatura ambiente, los utensilios usados para cortar son los mismos para todos los productos dándose contaminación cruzada entre ellos.

La presencia de *Shigella* (serogrupo A,B,C) en muestra de Salchicha Frankfurt es indicativo de la mala higiene, ya que al ser el hombre un reservorio de manera natural y la

contaminación se realiza de manera oral-fecal, además de otros contaminantes como son las moscas (Llop. y et 2001).

Del total de muestras analizadas (72) para *Escherichia coli,* 8 dieron crecimiento por encima de la Norma INEN 1338 que permite valores de < 3 ufc/g (0,47 log), lo cual significa ausencia de E coli (Figura 5). Mientras que como indicativo de contaminación por Coliformes Totales tres muestras dieron crecimiento durante los análisis (Figura 6).Su presencia es indicativo de la mala higiene por parte de los expendedores y su medio ambiente.

Mientras tanto *Staphylococcus aureus* (Figura 7-8) a pesar de que se encontró una muestra con un valor notorio (log 3.3), aún se encuentra dentro de los valores estipulados por la norma INEN 1338 (1.0×10^4), expresada en porcentaje la incidencia de Staphylococcus aureus encontradas es sólo de 1.38% de las muestras, siendo el 98.6% que no presentó crecimiento, su presencia puede deberse a la mala manipulación de parte de los vendedores.

-De una manera general sólo un 33.36% (24 muestras) del total de muestras analizadas (72 muestras, ver figura 9) se encontraron con las bacterias analizadas, siendo de estas bacterias las más relevantes la *Shigella* (5,5%) serogrupos A,B,C y la Eschericha coli (2,77%), (Figura 10) las mismas que son productoras de disenterías sanguinolentas en algunos de los casos muy graves.

Tomando el grado de contaminación en las tres marcas A,B,C, se observa en la Figura 11 que: *Providencia rustigianni,* en la marca A, se encontró dos muestras, en la marca B, en tres muestras y en la C, en una muestra; *Shigella serogrupo A,B, C*, creció en las marcas A y C, en dos muestras de cada una. *Acinetobacter iwoffi* estuvo presente en una muestra de las marcas B y C respectivamente; *Escherichia coli* se identificó en todas las marcas estudiadas en número de cuatro muestras para la marca A, dos muestras para B y dos para C; *Coliformes* fecales se encontraron en todas las marcas: una muestra de A, una muestra de B y una de C. Por último se observó el desarrollo de *Staphylococcus aureus* en una sola muestra de la marca A.

Al término de este estudio si bien no se encontró las bacterias propuestas, sirvió para conocer la presencia de otras enterobacterias no muy conocidas en el medio, capaz de producir enfermedades gastrointestinales que pueden afectar a personas vulnerables.

Una vez más está comprobado que las salchichas Frankfurt si bien, son sometidas a procesos térmicos durante su elaboración que impiden el crecimiento de bacterias enteropatógenas, es después, durante la manipulación, almacenamiento puede darse la contaminación ahora de bacterias poco distinguidas y de ahí la recomendación de comerlas siempre conocidas a temperatura óptima (90°C) que garanticen la inocuidad del producto.

Además podrá servir para posteriores estudios y enfocarse en estas bacterias (*Providencia rustigianni, Shigella serogrupo A,B, C, . Acinetobacter iwoffi)* y sus posible causas que hace posible su incidencia en este producto.

CONCLUSIONES.

- ✓ De las 60 muestras analizadas se obtuvo que 12 dieron positivos presuntivas para Salmonella, y de estas la *Providencia rustigianii* , *Acinetobacter iwoffi,* no son comunes en nuestro medio*,* pero si *Shigella Serogrupo A, B, C.*
- ✓ Del total de muestras analizadas (60) resultaron contaminadas 8 con *Escherichia coli,* lo que indica la contaminación presumiblemente por la inadecuada manipulación por parte de los expendedores así como la contaminación cruzada por los utensilios utilizados para cortar las diferentes carnes, la que en realidad sería muy poca.
- ✓ La falta de cadena de frío y el desconocimiento del personal, el riesgo que esto representa hace que estas circunstancias se den y no se tomen las medidas pertinentes.
- ✓ La ausencia de *Listeria Monocytógenes* en las muestras analizadas puede ser que esta bacteria no creció durante la elaboración del alimento posiblemente por la Buenas Prácticas de Manufactura de los fabricantes.
- ✓ Si bien dentro de este estudio las marcas analizadas A y B tienen ya implementado Certificación de Buenas Prácticas de Manufactura, sin embargo se encontró contaminación por enterobacterias, probablemente por mala conservación, contaminación cruzada e inadecuada manipulación del producto.
- ✓ Mediante este estudio se comprobó la presencia de otras Enterobacterias (*Providencia rustigianii* , *Acinetobacter iwoffi, Shigella Serogrupo A, B, C).* poco comunes, que podrían ser motivo de estudio específico, para una posterior investigación.
- ✓ La salchicha Frankfurt no debería ser consumida de manera inmediata sin previa cocción , ya que como se ha visto los microorganismos encontradas durante este estudio son indicativos de mala higiene que en personas vulnerables (niños, ancianos y personas inmunocomprometidas) puede ocasionar disenterías muy graves

- ✓ Mediante las capacitaciones a los expendedores e implementación de registros de limpieza por parte de las autoridades se pretende enseñar la importancia de llevar un buen aseo tanto personal así como la limpieza y desinfección de sus frigoríficos e infraestructura.

9. Bibliografía:

-Adams y Moss (2005) .Microbiología de Alimentos.. Zaragoza (España) Editorial Acribia, S.A.227-234-236-258p.

-.Doyle, Beuchat (2001), Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras. Zaragoza (España) Editorial Acribia, S.A.

- Hickman-Branner, JJ Farmer, 3rd, A G Steigerwalt, and D J Brenner J Clin Microbiol (1983) Junio 17 (6).

-ICMSF. (2002) Microorganismos en los Alimentos. Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria. Ordoñez J. et. Editorial ACRIBIA S.A. Zaragoza España. 278p.

- INEN Carne y productos cárnicos. Productos cárnicos crudos, productos cárnicos curados-madurados y productos cárnicos precocidos y cocidos. Requisitos NTN INEN 1338 Segunda Revisión Quito-Ecuador 2010.

- Martínez, C.(2000) Muestreo.Algunos métodos y sus aplicaciones prácticas.ECOE. Ediciones Bogotá Colombia.9-26p.

- Norma Sanitaria que establece los criterios Microbiológicos de calidad Sanitaria e Inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo Humano. Perú 2003.

- Revista Cubana de Salud Pública. Determinación de *Listeria spp*. en quesos y embutidos comercializados en Cuba 2005

- Stock I. & Wieddeman B. (1998). Natural antibiotic suseptibility of Providencia stuartii. P. rettgeri, P alcalifaciens and P rustigianii strains. Journal of medical ,microbiology, 47 (7), 629-672.

- Spiegel M. y Stephens L. (2009) Estadistica Schaun. Edición McGRAW HILL/ INTERAMERICANA EDITORES S.A. de C.V.245-247p

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS.

- Bad Bug Book (2012) [en linea] Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins - Second Edition. Disponible en: *http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf (Consultado Diciembre 20014)*

- Centros para el Control y la prevención de Enfermedades (2011) [en linea]. Disponible en:

http://www.cdc.gov/spanish/. (Consultado Marzo 2013).

- Codex Alimentarius.(2007) Directrices sobre la aplicación de principios generales de Higiene de los alimentos para el control de *Listeria Monocytógenes* en los alimentos. [CAC/GL 61 - 2007]. Disponible en http://*www.**codexalimentarius**.org/input/download/standards/.../CXG_061s.pdf*

(consultado: 10Enero 2014)

-Sistema Reveal® de Neogen Corp. (2005) [en linea]. Disponible en: **<**http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat.workshopmrama/files/Reveal_pathogenic_bacteria.pdf> (consultado: 10 Mayo 2013).

-Ministerio de Salud Pública (2013) Gaceta Epidemiológica Semanal SIVE-ALERTA 2012-2013.[en linea].Disponible en :<http://www.salud.gob.ec/gaceta-epidemiologica-ecuador-sive-alerta-2013/>.(consultado: 20 de diciembre 2013).

-Koneman & et. (2008) Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas en color. 6° Edición [en linea]. Editorial Médica Panamericarna. Disponible en < <http://books.google.es/books?id=jyVQueKro88C&printsec=frontcover&dq=inauthor:%22Elmer+W.+Koneman%22&hl=es&sa=X&ei=wamAU6DG.> (Consultado: el 15 de marzo 2014).

-Llop A.; Valdéz M.; Zuazo L. (2001) Microbiologico y Parasitología MédicasTomo 1 [en linea]. Editorial Ciencias Médicas. Disponible en < http://www.segemar.gov.ar/bibliotecaintemin/LIBROSDIGITALES/CubaAguaParametrosBibliografiaVariada/ManualesOPS,%20PNUMA,%20otros/microbiologia_tomoi.pdf >(consultado: el 17 de marzo 2014).

ANEXOS

Anexo I.

Nº de casos de enfermedades transmitidas por agua y alimentos		
Enfermedad inicial	2013	2014
	Confirmado	Confirmado
Hepatitis aguda tipo a	1437	2722
Infecciones debidas a salmonella	790	1169
Fiebres tifoidea y paratifoidea	647	1003
Intoxicaciones alimentarias agudas	1638	3879
Shigelosis	57	136

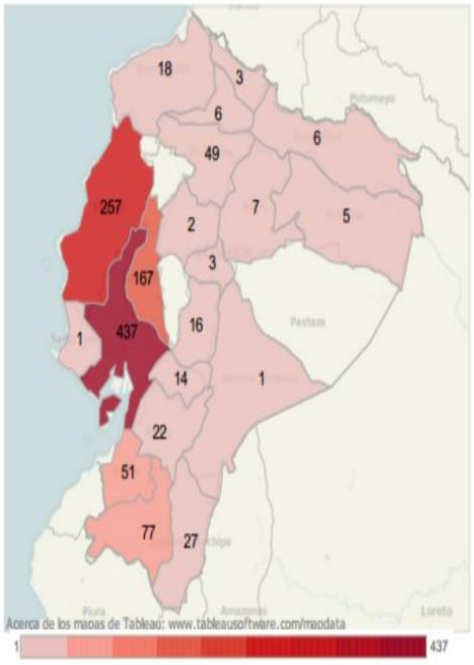
Fuente: Ministerio de Salud Pública del Ecuador Gaceta Epidemiológica Semana 16 SIVE- Alerta 2014.

Anexo II. Número de casos de Salmonella por Provincia

Número de casos de Salmonella, por provincias y semana epidemiológica.

Provincia	Semana (grupo) SE 1- 15	SE 16	Total ge..
AZUAY	20	2	22
CAÑAR	14		14
CARCHI	3		3
CHIMBORAZO	16		16
COTOPAXI	2		2
EL ORO	50	1	51
ESMERALDAS	16	2	18
GUAYAS	423	14	437
IMBABURA	6		6
LOJA	77		77
LOS RIOS	160	7	167
MANABI	245	12	257
MORONA SANTI..	1		1
NAPO	6	1	7
ORELLANA	5		5
PICHINCHA	46	3	49
SANTA ELENA	1		1
SUCUMBIOS	6		6
TUNGURAHUA	3		3
ZAMORA CHINC..	27		27
Total general	1.127	42	1.169

Número de casos de Salmonella, por provincia.



Fuente: Ministerio de Salud Pública. Gaceta Epidemiológica Semanal (16) SIVE-ALERTA 2014.

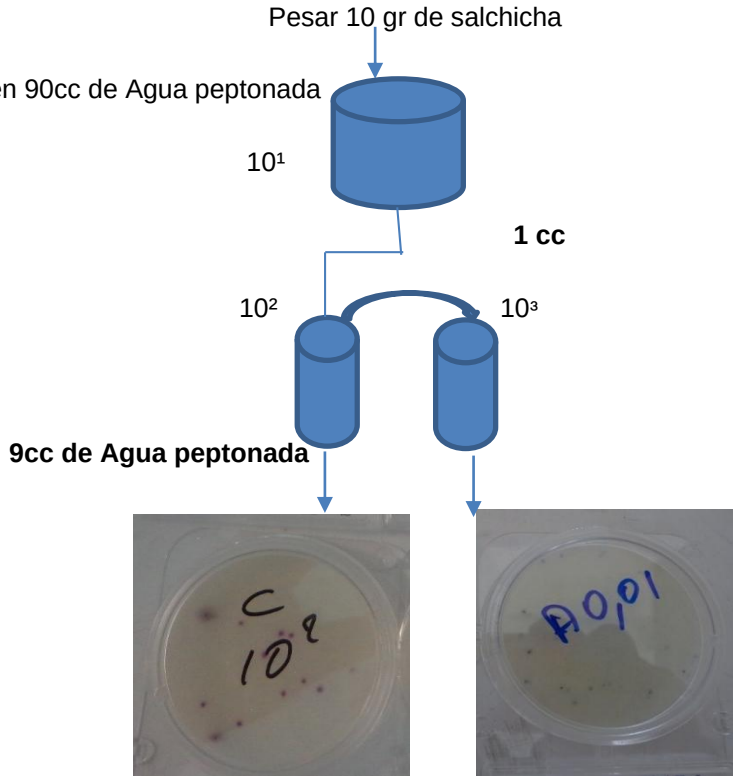
Anexo III.- Norma INEN 1338

TABLA 10. Requisitos microbiológicos para productos cárnicos cocidos

REQUISITOS	n	c	m	M	METODO DE ENSAYO
Aerobios mesófilos,* ufc/g	5	1	$5,0x10^5$	$1,0x10^7$	NTE INEN 1529-5
Escherichia coli ufc/g*	5	0	< 3	-	NTE INEN 1529-8
Staphylococcus* aureus, ufc/g	5	1	$1,0x10^3$	$1,0x10^4$	NTE INEN 1529-14
Salmonella/ 25 g**	10	0	ausencia		NTE INEN 1529-15
* Requisitos para determinar tiempo de vida útil ** Requisitos para determinar inocuidad del producto					

Fuente: Norma NTE INEN 1338

ANEXO IV.- Identificación de Coliformes Fecales y Escherichia Coli por método de Compac Dry.



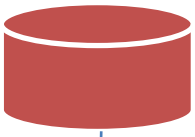
Se procede a contar las colonias, en el caso de colonias púrpura, presencia de *Coliformes* totales y colonias azules presencia de *E.coli.*

Anexo V.- Identificación de Salmonella Y Método Migrogen GNID Panel A y Panel B, Programa MID 60

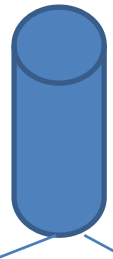
FLUJOGRAMA DE ANÁLISIS DE SALMONELLA

Pesar 25 g de embutido (Salchicha Frankfurt).

250ml medio lactosado (Incubar 37°C x 24 horas)

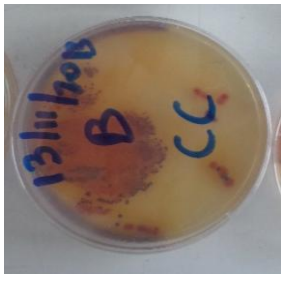


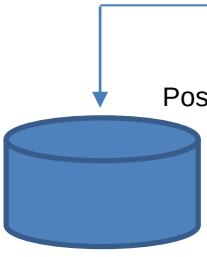
0.1 cc



10 cc Tetrationato (Incubar 42°C x 24horas)

Sembrar por estría en placa de agar SS y medio de Cromocult. Incubar a 37°C por 24 h





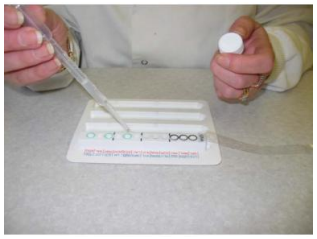
Positivo

Sembrar en Agar Nutritivo a 37°C por 24 horas

Tomar una colonia y hacer Prueba de Oxidasa.

Colocar una colonia en suero fisiológico estéril agitar

Añadir de 2 a 3 gotas de la suspensión en cada pocillo (deberían estar llenas al 30-40%, demasiado inóculo imposibilitará la adición de reactivo).



Cubrir los pocillos con aceite mineral de 2-3 gotas, solamente los indicados (los cuales están señalados con una línea negra).

Cerrar herméticamente con la cinta adhesiva. Incubar 18- 37°C para Gen A 24 horas y para Gen B 48 horas.

Leer con la tabla de colores:

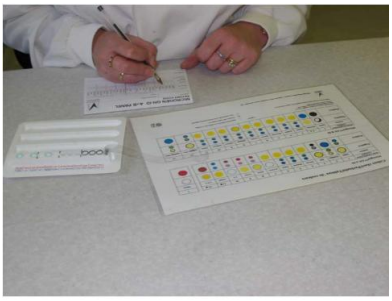
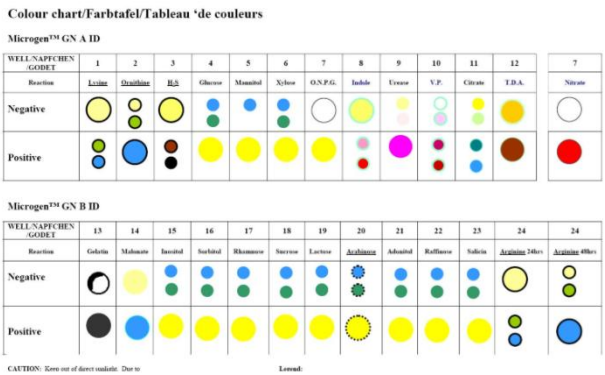


Tabla de colores:



Colour chart/Farbtafel/Tableau 'de couleurs

Microgen™ GN A ID

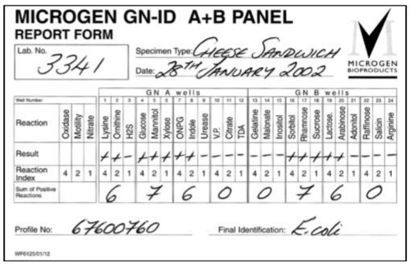
WELL/NAPFCHEN /GODET	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	7
Reaction	Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Xylose	O.N.P.G.	Indole	Urease	V.P.	Citrate	T.D.A.	Nitrate
Negative													
Positive													

Microgen™ GN B ID

WELL/NAPFCHEN /GODET	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	24
Reaction	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine 24hrs	Arginine 48hrs
Negative													
Positive													

CAUTION: Keep out of direct sunlight. Due to Legend:

Leer en la tabla ver código y leer el nombre de la bacteria identificada en el Programa de Gen A y Gen B.



MICROGEN GN-ID A+B PANEL
REPORT FORM

Lab. No. 3341
Specimen Type: CHEESE SANDWICH
Date: 28TH JANUARY 2002

MICROGEN BIOPRODUCTS

Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result				+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions				6			7			6			0			0			7			6			0		

Profile No: 67600760
Final Identification: E. coli

Anàlisis de resultados con el programa MID-60

(*Instructivo de Microgen Bioproductos)*

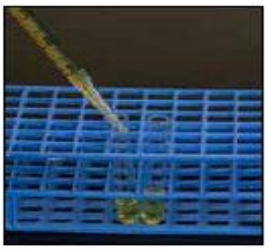
Anexo VI.- Análisis de *Listeria spp*, mediante método de Reveal 2.0

Reveal 2.0 for *Listeria* Procedure

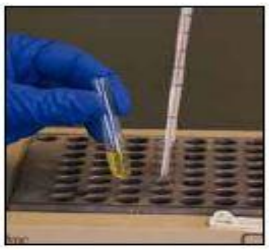
Environmental Samples

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° ± 1°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.

Anexo VII

Resultados de presuntivos de *Salmonella spp* en muestras de salchichas Frankfurt

Muestra Puesto 1 Puesto 1	Presuntivo de Salmonella
20131021 A	Negativo
20131021 B	Negativo
20131021 C	Negativo
Muestra Puesto 2	
20131023 A	Positivo
20131023 B	Negativo
20131023 C	Negativo
Muestra Puesto 3	
20131025 A	Negativo
20131025 B	Negativo
20131025 C	Negativo
Muestra Puesto 4	
20131028 A	Negativo
20131028 B	Negativo
20131028 C	Negativo
Muestra Puesto 5	
20131030 A	Negativo
20131030 B	Negativo
20131030 C	Negativo
Muestra Puesto 6	
20131101 A	Negativo
20131101 B	Negativo
20131101 C	Negativo
Muestra Puesto 7	
20131104 A	Positivo
20131104 B	Negativo
20131104 C	Positivo.

Muestra Puesto 8	
20131106 A	Negativo
20131106 B	Negativo
20131106 C	Negativo
Muestra Puesto 9	
20131108 A	Negativo
20131108 B	Negativo
20131108 C	Negativo
Muestra Puesto 10	
20131111 A	Negativo
20131111 B	Negativo
20131111 C	Positivo
Muestra Puesto 11	
20131113 A	Negativo
20131113 B	Positivo
20131113 C	Negativo
Muestra Puesto 12	
20131115 A	Negativo
20131115 B	Negativo
20131115 C	Negativo
Muestra Puesto 1	
20131118 A	Negativo
20131118 B	Negativo
20131118 C	Negativo
Muestra Puesto 2	
20131120 A	Negativo
20131120 B	Negativo
20131120 C	Negativo
Muestra Puesto 3	
20131123 A	Negativo
20131123 B	Positivo
20131123 C	Positivo
Muestra Puesto 4	
20131125 A	Positivo
20131125 B	Positivo

20131125 C	Negativo
Muestra Puesto 5	
20131127 A	Negativo
20131127 B	Negativo
20131127 C	Negativo
Muestra Puesto 6	
20131129 A	Negativo
20131129 B	Positivo
20131129 C	Negativo
Muestra Puesto 7	
20131202 A	Negativo
20131202 B	Negativo
20131202 C	Negativo
Muestra Puesto 8	
20131204 A	Positivo
20131204 B	Negativo
20131204 C	Negativo
Muestra Puesto 9	
20131206 A	Negativo
20131206 B	Negativo
20131206 C	Negativo
Muestra Puesto 10	
20131209 A	Negativo
20131209 B	Negativo
20131209 C	Negativo
Muestra Puesto 11	
20131211 A	Negativo
20131211 B	Negativo
20131211 C	Negativo
Muestra Puesto 12	
20131213 A	Negativo
20131213 B	Negativo
20131213 C	Positivo

Anexo VIII

Resultados de E.coli/Coliformes en muestras de salchicha Frankfurt

Muestra Puesto 1	Log E coli /	Coliformes Fecales
20131021 A	5.55	
20131021 B	<1	
20131021 C	<1	
Muestra Puesto 2		
20131023 A	<1	
20131023 B	<1	
20131023 C	1.07	
Muestra Puesto 3		
20131025 A	<1	
20131025 B	<1	
20131025 C	<1	
Muestra Puesto 4		
20131028 A	<1	
20131028 B	<1	
20131028 C	<1	
Muestra Puesto 5		
20131030 A		2.47 CC
20131030 B		2.90 CC
20131030 C		2.84 CC
Muestra Puesto 6		
20131101 A	<1	
20131101 B	<1	
20131101 C	<1	
Muestra Puesto 7		
20131104 A	<1	
20131104 B	<1	
20131104 C	<1	
Muestra Puesto 8		
20131106 A	<1	
20131106 B	<1	
20131106 C	<1	
Muestra Puesto 9		
20131108 A	<1	
20131108 B	<1	
20131108 C	<1	
Muestra Puesto 10		
20131111 A	<1	
20131111 B	<1	

20131111 C	<1	
Muestra Puesto 11		
20131113 A	<1	
20131113 B	<1	
20131113 C	<1	
Muestra Puesto 12		
20131115 A	<1	
20131115 B	<1	
20131115 C	2	
Muestra Puesto 1		
20131118 A	2.69	
20131118 B	<1	
20131118 C	<1	
Muestra Puesto 2		
20131118 A	<1	
20131118 B	<1	
20131118 C	<1	
Muestra Puesto 3		
20131123 A	<1	
20131123 B	<1	
20131123 C	<1	
Muestra Puesto 4		
20131125 A	3.60	
20131125 B	3.95	
20131125 C	4.3	
Muestra Puesto 5		
20131127 A	<1	
20131127 B	<1	
20131127 C	<1	
Muestra Puesto 6		
20131129 A	<1	
20131129 B	<1	
20131129 C	<1	
Muestra Puesto 7		
20131202 A	2	
20131202 B	<1	
20131202 C	<1	
Muestra Puesto 8		
20131204 A	<1	
20131204 B	<1	
20131204 C	<1	

Muestra Puesto 9		
20131206 A	<1	
20131206 B	<1	
20131206 C	<1	
Muestra Puesto 10		
20131209 A	<1	
20131209 B	2.6	
20131209 C	<1	
Muestra Puesto 11		
20131211 A	<1	
20131211 B	<1	
20131211 C	<1	
Muestra Puesto 12		
20131213 A	<1	
20131213 B	<1	
20131213 C	<1	