



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de
la seguridad de los
alimentos listos para el
consumo

Alumno: Celia Moraleda Delgado

Junio, 2017



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis microbiológico de la seguridad de los alimentos listos para el consumo



Alumno: Celia Moraleda Delgado

Junio, 2017

0. RESUMEN Y ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Alimentos listos para el consumo.....	4
1.2. Microbiota de alimentos.....	6
1.2.1. Factores intrínsecos.....	7
1.2.2. Factores extrínsecos.....	7
1.3. Riesgo de los alimentos listos para el consumo.....	11
1.4. Métodos de conservación para alimentos listos para el consumo.....	12
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS	17
3.1. Muestras de alimento.....	17
3.2. Medios de cultivo.....	18
3.3. Material de laboratorio empleado.....	23
3.4. Determinación de la carga microbiana total y de patógenos.	24
3.5. Tinción diferencial de Gram.	25
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Determinación de la carga microbiana.....	27
4.2. Detección de patógenos presentes en cada alimento.....	30
5. DISCUSIÓN.....	34
6. CONCLUSIONES.....	36
7. BIBLIOGRAFÍA.....	37

0. RESUMEN

La seguridad alimentaria es uno de los temas prioritarios a abordar tanto en industria alimentaria como en restauración en cualquiera de sus ámbitos. Debido a la creciente preocupación del consumidor por el riesgo a producir infecciones o intoxicaciones, el ámbito legal dentro de la Unión Europea, obliga a todos los trabajadores de la empresa del sector a desarrollar programas y procedimientos que aseguren la inocuidad de sus productos y elaboraciones, basadas en principios del Análisis de Peligros y Puntos de control Críticos (APPCC).

Este sistema se fundamenta científicamente y tiene carácter sistemático, y en él se explican los pasos a seguir para evaluar los peligros específicos y establecer medidas de control basadas en prevención, eliminación y/o reducción de éstos niveles aceptables en cada una de las fases específicas del proceso, en lugar de realizar este análisis en las elaboraciones finales, lo que supone una ventaja para la empresa a múltiples niveles. Además también hay que tener en cuenta los requisitos previos que deben adaptarse a los principios de higiene alimentaria según impone el *Codex Alimentarius*.

ABSTRACT

Food safety has an objective to approach as a priority both in food industry and catering in any of its fields. Following this growing consumer concern by the risk to produce infections or intoxications, the legal field within the European Union, force operators of the sector companies to develop programs and procedures to guarantee the safety of their products and elaborations, based on the principles of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP).

This system is scientifically proven and is systematic, and the present work formulates the steps to follow to evaluate the specific dangers and establish control measures based on prevention, elimination and / or reduction of these to acceptable levels in each of the specific phases of the process, rather than perform this analysis in the final elaborations, which is an advantage for the company at multiple levels. In addition, the work also explains how to develop the prerequisites that had to be taken according to the principles of food hygiene as dictated by the *Codex Alimentarius*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alimentos listos para consumo

Como consecuencia del actual ritmo de vida, la incorporación de la mujer al mundo laboral y cada vez mayor la preocupación por la ingesta de alimentos para llevar una vida sana ha influido en los últimos años de forma directa en nuestra forma de vida, tanto en los hábitos alimentarios como en reducir cada vez más el tiempo que se dedica a cocinar en los hogares.

En la actualidad el consumidor está interesado en alimentos en los que el tiempo de cocinado o preparación sea el mínimo (López *et al.*, 2010).

Con mayor frecuencia, esto se da sobre todo en las grandes ciudades, donde existe un mayor consumo de comidas preparadas tanto en la propia casa como fuera de la misma. Como consecuencia de esta situación, la industria alimentaria ha transformado alimentos ya procesados (jamón cocido, jamón serrano, embutido, quesos frescos y curados, hortalizas frescas, pescado ahumado etc.) en productos listos para su consumo, cuya distribución se realiza en envases, por lo que esto implica una reducción de su tamaño (lonchas, filetes, rodajas, etc.). En otros casos son las grandes superficies, en algunos casos los minoristas, los que preparan raciones familiares, envasándolas de forma adecuada para su exposición y venta en vitrinas refrigeradas, llamando así la atención del consumidor. Sólo hace falta echar un vistazo a cualquier gran superficie y podremos comprobar la existencia de numerosas vitrinas en las cuales exponen numerosos y variados productos precocinados, tanto de origen animal como vegetal, para su venta (Ordóñez *et al.*, 2007).

Esta evolución en los hábitos alimentarios, es la consecuencia directa de la creación de los envases, ya no sólo por su utilidad para contener o conservar los alimentos, sino también para llamar la atención del consumidor sirviendo así como parte de la campaña de marketing. Para ello, se realizan numerosos estudios y diseños con el objetivo de mantener el mayor tiempo posible los

alimentos frescos y a su vez que estos llamen la atención del consumidor aumentando las ventas del mismo (López *et al.*, 2010).

Cualquier acción llevada a cabo como trocear, lonchear, dosificar, el envasado u otras van a facilitar la venta o el trabajo de realizarlo en casa, pero esto conlleva un incremento en los riesgos para que se produzca una contaminación. En cualquiera de las operaciones mencionadas, diversos microorganismos patógenos, procedentes del entorno que les rodea, utensilios empleados en cada una de las acciones, manipuladores, máquinas de corte, etc. pueden rápidamente alcanzar el alimento. Por lo que se hace necesario, llevar a cabo una serie de pautas para higienizar el producto listo para el consumo antes de que pueda ser consumido por el cliente (Ordóñez *et al.*, 2007).

La moderna industria alimentaria, aparte de la producción de alimentos tradicionales, realiza sus actividades con la mayor orientación posible de acuerdo con la demanda del cliente, sin dejar atrás las exigentes normas higiénicas impuestas por las autoridades sanitarias sobre la seguridad requerida para los alimentos listos para consumo y las necesidades nutricionales de la población teniendo en cuenta tanto las necesidades de carácter general (alimentos saludables) o las necesidades en particular, para determinadas personas sensibles (hipertensos, ancianos, celíacos, inmunocomprometidos, diabéticos, obeso, etc.). La industria occidental incluida la industria española, no ha sido ajena a la demanda de los consumidores, y por lo tanto ha evolucionado para lograr satisfacer los requisitos del actual ritmo de vida, por ello se han creado nuevos productos de acuerdo a esta demanda, nuevas formulaciones, productos a los que se le ha añadido ingredientes tecnológicos y funcionales o nuevas maneras a la hora de la presentación del producto tradicional para así conseguir un mayor consumo de los mismos. Y por otra parte, se ha tenido en cuenta la necesidad de investigar las consecuencias del porque se han producido algunos cambios dando lugar a la producción de nuevos productos (Ordóñez *et al.*, 2007).

Aspectos a tener en cuenta para escoger los alimentos listos para el consumo que se encuentran en supermercados:

- Que se encuentren correctamente empaquetados
- Que su aspecto nos de la confianza de que el producto está limpio
- Almacenados a la temperatura correcta

En cuanto a los alimentos que tenemos en casa listos para su consumo hay que tener en cuenta:

- Almacenamiento a la temperatura correcta que requiera el producto
- Consumir antes de la fecha de caducidad
- Tener en cuenta el día en que el producto se abrió
- El producto debe ser desechado tres días después de haber sido abierto (Hillan y Simonne, 2016).

Como ya he mencionado lo importante que es la evaluación de los riesgos microbiológicos en los alimentos listos para el consumo, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) desempeñan un papel clave en la elaboración y la normalización de los riesgos microbiológicos en alimentos listos para el consumo a nivel internacional, con el objetivo de informar acerca de los riesgos en los alimentos tanto en ámbito nacional como internacional (FAO y OMS, 2004).

1.2. Microbiota de alimentos

Por microorganismo entendemos cualquier organismo vivo que no sea visible a simple vista, y para su observación es necesario el uso del microscopio. Se clasifican en: bacterias, hongos (levaduras y mohos), virus y parásitos (Herrera y Troyo, 2011).

El término crecimiento microbiano se refiere al aumento del número de células. La rapidez de crecimiento será mayor cuando todas las condiciones sean las óptimas. Cualquier modificación o alteración en esas condiciones

óptimas se verá reflejada en la velocidad de crecimiento microbiano. Cuanto mayor sea la velocidad de crecimiento microbiano mayor será el consumo de nutrientes, provocando mayores alteraciones en el alimento. Pero los microorganismos no sólo consumen los nutrientes presentes en los alimentos, sino que van a modificar los compuestos presentes produciendo alteraciones y por lo tanto deterioro. Algunas consecuencias de este deterioro son: la presencia del mal olor, de mucosidad, de aromas y sabores anormales. Los microorganismos que producen este deterioro reciben el nombre de microorganismos de alteración o deterioro (EACEA, 2006).

Los principales factores que favorecen el crecimiento microbiano son:

1.2.1. *Factores intrínsecos* (características físico-químicas de los alimentos)

- Alimentos: para su supervivencia, los microorganismos necesitan sobretodo proteínas y carbohidratos.
- pH: mide la acidez del alimento. Y encontramos condiciones ácidas (pH: 1-6), neutras (alrededor a 7) y alcalinas o básicas (pH: 8-14). Éste varía con la cantidad de compuestos ácidos y básicos existentes en el medio. Es importante saber que el crecimiento de un microorganismo apenas tiene lugar dentro de un determinado rango de pH. Hay que destacar que el pH no sólo afecta al crecimiento microbiano sino que también a su tasa de supervivencia durante el almacenamiento y los distintos métodos de conservación (Martin y Maurice, 2008).
- Disponibilidad del agua: es uno de los factores principales que nos indica la facilidad con la que un microorganismo determinado puede crecer en el alimento y deteriorarlo. El crecimiento de microorganismos en los alimentos está determinadado en gran parte por la disponibilidad de agua en el alimento.
- Oxígeno disponible: algunos microorganismos no necesitan oxígeno. Pero para algunos es imprescindible para realizar la respiración aeróbica (Banwart, 1989).

1.2.2. Factores extrínsecos (condiciones de almacenaje y ambientales)

- Temperatura: la temperatura óptima para la mayoría de microorganismos se encuentra entre los 5°C y los 60°C. Dentro de este rango de temperatura la velocidad de crecimiento de muchos microorganismos es muy acelerada. En algunas ocasiones los microorganismos son clasificados en función de la temperatura óptima para su crecimiento: termófilos (40°C y 65°C), mesófilos (20°C y 40°C), psicrótrofos (15°C o por debajo) y psicrófilos (crecen entre 0°C y 7°C). Hay que tener en cuenta que el calor origina la muerte de los microorganismos y el frío sólo inhibe o retrasa su crecimiento (Martin y Maurice, 2008).
- Humedad relativa: cuando se encuentra en condiciones elevadas favorece el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, de forma más específica a aquellos que se encuentran en la superficie.
- Oxígeno (Atmósfera): existen microorganismos anaerobios que no toleran la presencia de oxígeno llegando incluso a morir y por otro lado microorganismos aerobios en los cuales el oxígeno es fundamental para su supervivencia.
- Tiempo: los microorganismos necesitan mantenerse durante un determinado tiempo en condiciones óptimas para crecer (Banwart, 1989).

En cuanto a los principales microorganismos patógenos que provienen del entorno, utensilios empleados, manipulación, etc. y por lo tanto pueden alcanzar rápidamente el alimento, encontramos (Ordóñez *et al.*, 2007):

-*Salmonella* spp.: es considerada una productora de zoonosis de distribución mundial. La vía de transmisión es fecal-oral a través de alimentos y agua contaminada, materiales y utensilios empleados en la cocina contaminados o por contacto directo de persona a persona. Las principales fuentes de infección son las carnes (aves de corral, bovino y porcino) y los huevos (ANMAT federal, 2011).

-*Campylobacter* : es una bacteria fecal que se encuentra fácilmente en el intestino de personas y animales. Lo productos con mayor riesgo que pueden

contaminarse con esta bacteria son los que se consumen en crudo (las carnes, pollo, pescado y mariscos) (Herrera y Troyo, 2011).

-Enterobacterias: reciben este nombre porque habitualmente se encuentran en el tubo digestivo como saprófitos, aunque son gérmenes ubicuos, que se encuentran de forma universal en agua, suelo y vegetación, aunque también los encontramos formando parte de la microbiota intestinal normal de muchos animales además del hombre. *Escherichia coli* es el microorganismo más relevante de esta familia (Puerta y Mateos-Rodríguez, 2006).

Escherichia coli: su principal reservorio se encuentra en los rumiantes en general y en particular se encuentra en el ganado vacuno. La principal vía de transmisión son los alimentos contaminados como la carne picada, productos cárnicos crudos o poco cocidos, embutidos fermentados, etc. Otra forma de transmisión es a través de la contaminación cruzada ya sea durante la preparación de alimentos, el contacto directo del hombre con los animales y de persona a persona de forma fecal-oral (ANMAT federal, 2011).

- *Listeria monocytogenes*: es considerada uno de los principales agentes de enfermedades de transmisión alimentaria, esto es debido a: su elevada distribución en la ganadería y en el ambiente, su largo periodo de incubación de 3 a 70 días, los cambios de gran importancia en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos, cambios en los hábitos de comida (alimentos preparados) (Sánchez, 2011). Es un patógeno alimentario que crece a temperatura de refrigeración (Jang *et al.*, 2006). La enfermedad que produce recibe el nombre de listeriosis, y ocurre normalmente por vía intestinal, puede presentarse en forma de gastroenteritis, fiebre, náuseas, vómitos, etc (enfermedad no invasiva) o puede producir meningitis, abortos y septicemia (enfermedad invasiva) (ANMAT federal, 2011).

-*Enterococcus*: habitan en el tracto gastrointestinal, de distintos organismos, incluido el hombre. Pueden encontrarse también en el tracto genitourinario y en la saliva (Díaz *et al.*, 2007). También son considerados patógenos oportunistas en humanos pudiendo causar enfermedades como: endocarditis,

bacteriemias enterocócicas, infecciones del tracto urinario entre otras (Porte *et al.*, 2007). Estos organismos en estos últimos años han intensificado su importancia como patógenos nosocomiales, a pesar que producen una baja virulencia (Rodríguez *et al.*, 2010).

- *Bacillus cereus*: se encuentra frecuentemente como una bacteria saprófita del agua, vegetación, suelo y aire, por lo que se transmite muy fácilmente a los alimentos (Pérez., 2012). Los alimentos más propensos a ser contaminados son: harina, carnes, leches, quesos, arroz y sus derivados, verduras y pescado. A rasgos generales podemos decir que contamina frecuentemente alimentos con alto contenido en almidón (Sánchez *et al.*, 2016).

-*Staphylococcus aureus*: es una de las bacterias principales relacionadas con las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Generalmente estas contaminaciones son producidas por el contacto directo que hay entre el manipulador de alimentos y los alimentos. Los alimentos más propensos de contaminarse son los que están en contacto con la piel del animal como son los huevos, leche, productos cárnicos. Los síntomas producidos son: náuseas, dolor abdominal, emesis, diarrea y postración. En los casos más graves se puede producir cefalea y choque (Zendejas- Manzo *et al.*, 2014).

1.3. Riesgos de los alimentos listos para el consumo

TIPO DE RIESGO	DENOMINACIÓN Y NUMERACIÓN DEL PROGRAMA DE CONTROL	PRINCIPALES TIPOS DE PRODUCTOS
RIESGOS BIOLÓGICOS	3: RIESGOS BIOLÓGICOS (A)	Platos preparados. Prod. Pesca y acuicultura. Frutos secos. Carne y derivados cárnicos. Leche y prod. Lácteos. Huevos y ovoproductos. Prod. Pastelería. Horchatas. Etc.
	4: TOXINAS BIOLÓGICAS: BIOTOXINAS MARINAS	
RIESGOS QUÍMICOS	5:CONTAMINANTES EN ALIMENTOS (B)	Frutas y hortalizas. Prod. Pesca y acuicultura. Carne y derivados cárnicos. Aceites y grasas. Conservas. Platos preparados. Leche y prod. Lácteos. Etc.
	6: RESIDUOS DE PLAGUICIDAS	
	7: INGREDIENTES TECNOLÓGICOS (C)	
	8: RESIDUOS DE DETERMINADAS SUSTANCIAS EN PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL (D)	
RIESGOS VINCULADOS A	9: ALERGENOS Y SUSTANCIAS QUE PROVOCAN INTOLERANCIAS	Productos alimenticios envasados.

LA COMPOSICIÓN	10: ALIMENTOS BIOTECNOLÓGICOS (OMG´S)	Frutas y hortalizas. Derivados de cereales.
	11: FÍSICO-QUÍMICO	Prod. Pastelería. Etc.

(A) RIESGOS BIOLÓGICOS: Se incluye cualquier contaminación por microorganismos y/o sus toxinas. Se incluye *Salmonella* spp, Histamina y *Anisakis*.

(B) CONTAMINANTES EN ALIMENTOS: Se incluyen metales pesados (Hg, Cd, Pb), estaño inorgánico, nitratos, HAP y micotoxinas, (como aflatoxina, ocratoxina, patulina, etc), entre otros.

(C) INGREDIENTES TECNOLÓGICOS: Se incluyen aditivos, aromas y enzimas.

(D) RESIDUOS DE DETERMINADAS SUSTANCIAS EN PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL: Se incluyen medicamentos veterinarios, sustancias prohibidas, etc.

ANEXO I: Estructura de los distintos tipos de riesgos en relación con sus correspondientes Programas de Control integrados en el citado Plan de Actividades Programadas en materia de Control Oficial de Alimentos (Instituto de Salud Pública Seguridad Alimentaria, 2011, *Guía de muestreo e interpretación de resultados analíticos de productos alimenticios*).

1.4. Métodos de conservación de alimentos listos para consumo

Existe una serie de métodos a través de los cuales el alimento no se altera tan rápidamente, estos métodos reciben el nombre de “métodos de conservación”. Debido a estos métodos los alimentos aguantan más tiempo en buenas condiciones (Herrera y Troyo, 2011).

Lo que queremos conseguir con la conservación de los alimentos es:

- Eliminar cualquier microorganismo presente en el alimento. Cuando las temperaturas son altas el microorganismo muere.
- Reducir cuanto sea posible el número de microorganismos presentes en el alimento, hasta que el número se encuentre dentro de los rangos determinados que no son perjudiciales para la salud.
- Impedir que los microorganismos que ya están presentes en el alimento proliferen.
- Esto se consigue llevando a cabo unas condiciones que no sean las óptimas para que el microorganismo se desarrolle: disminución de la temperatura, eliminación del agua y acidificación del medio.
- Impedir a las enzimas que sean capaces de producir reacciones químicas que deterioren los alimentos (Aguilar, 2012).

Tipos de métodos de conservación:

- Métodos de conservación por calor.

- Pasteurización: tratamiento térmico con el que se produce la eliminación de microorganismos patógenos que se encuentran en los alimentos. Se puede realizar de dos formas distintas: se emplean temperaturas de 60-65°C durante un tiempo prolongado (3-4 horas) o bien se emplean temperaturas más altas de 75-90°C pero durante un tiempo menor (2-5 minutos) (Juliarena y Gratton, 2006).
- Esterilización comercial: es un tratamiento térmico que se aplica a los alimentos para destruir las esporas de *Clostridium botulinum*. Las temperaturas a las que se somete se encuentran en torno a 115°C y 127°C y durante unos 20 minutos aproximadamente. Este proceso generalmente se aplica a los enlatados (López y Antolín, 2010).

- Métodos de conservación por frío.

- Congelación: se utiliza para conservar gran cantidad de productos alimenticios. Los alimentos que se congelan en las grandes superficies de comercio se guardan a -10°F y 20°F. La congelación no elimina los microorganismos, pero si es capaz de detener el crecimiento, es decir, los mantiene en un estado de latencia. Sin embargo, algunas bacterias si se mueren durante la congelación debido a la rotura de su estructura celular.

La temperatura ideal que el alimento debe alcanzar lo más rápido posible es de -18°C , así mantiene las características sensoriales del alimento, una vez que procedemos a descongelarlo (Clayton *et al.*, 2008).

- Refrigeración: se trata de un método de conservación a corto plazo, pueden ser días o semanas, dependiendo del tipo de alimento y las condiciones de higiene del alimento. La temperatura idónea de refrigeración está entre los 0°C y 5°C , donde el producto se mantiene fresco y además se retarda el crecimiento de la mayoría de microorganismos, especialmente aquellos que son patógenos. Este método es empleado en alimentos que se van a consumir de forma rápida (USDA, 2010).

- Métodos de conservación por medio de productos químicos.

- Conservante: su acción es retardar la reproducción de los microorganismos. Se recomienda su empleo en alimentos envasados, en los cuales el consumo no es inmediato. Su empleo está regulado por la industria alimentaria de sanidad. Algunos ejemplos son el benzoato de sodio, ácido sórbico, propionato de sodio, etc. Un conservante no debe producir daño perjudicial a la salud del consumidor y tampoco debe variar las características sensoriales del alimento (Ibáñez *et al.*, 2003).

- Atmosferas protectoras: esta técnica se aplica a muchos productos procedentes de distinta naturaleza (vegetales, carnes, pescado, lácteos, etc.). Su objetivo principal es mantener la calidad sensorial de los alimentos y alargar su vida comercial. Todo esto se consigue con la eliminación del aire contenido en el paquete, y a continuación en función de las propiedades del alimento se puede realizar la inyección de un gas o varios gases. De esta forma se va a generar un ambiente gaseoso adecuado para la conservación del producto, donde el envase formará como una barrera de tal forma que aísla el producto del ambiente de la atmósfera externa.

Existen tres tipos de atmosferas protectoras:

- Vacío: cuando se elimina por completo el aire de la atmósfera interior.

- **Atmósfera controlada:** cuando tras la eliminación del aire se procede a la inyección del gas-gases y se somete a un control constante durante el periodo de almacenamiento.
- **Atmósfera modificada:** se elimina el aire del envase, y a continuación introducimos una atmósfera que ha sido creada artificialmente, en la que la composición de la misma no puede controlarse a lo largo del tiempo.

En los sistemas de envasado en atmósfera protectora hay 3 componentes básicos: los gases, el material de envasado y los equipos de envasado (García *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

1. Determinar la carga microbiana total de alimentos listos para consumo.
2. Determinar la presencia de microorganismos patógenos.
3. Riesgos de alimentos listos para consumo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras de alimentos

Hemos seleccionado un total de seis alimentos para realizar el análisis microbiológico de alimentos listos para el consumo.

Cuatro de ellos pertenecen a alimentos listos para el consumo que se venden en supermercados, y los cuales son:

Muestra 1: Ensalada mixta

Muestra 2: Untapán de cangrejo

Muestra 3: Ensaladilla Rusa

Muestra 4: Ensalada de quinoa



Fig.1. Alimentos empleados para el análisis microbiológico

Por otro lado, emplee dos alimentos preparados y expuestos al consumidor en vitrinas, para su consumo directo, estos son:

Muestra 5: Pollo villaroy

Muestra 6: Arroz con leche



Fig.2. Alimentos empleados para el análisis microbiológico

3.2. Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el crecimiento de los microorganismos. Se deben tener unas condiciones adecuadas en el laboratorio para realizar un correcto cultivo sin ningún tipo de contaminación para no obtener resultados incorrectos. Se debe sembrar sobre el medio de cultivo elegido las muestras que contienen los microorganismos que van a crecer y multiplicarse para poder realizar posteriormente un recuento de colonias. Todos los medios de cultivo fueron adquiridos de la casa comercial Scharlab (España)

- Medio Soja Triptona agar (TSA)

Se emplea como medio de uso general para el cultivo de todo tipo de microorganismos. Los componentes son los siguientes:

Polisorbato 80	5 g/L
Hisditina	1 g/L
Peptona de Soja	5 g/L
Sodio Tiosulfato	0,5 g/L
Lecitina	0,7 g/L
Peptona de Caseína	15 g/L
Sodio Cloruro	5 g/L
Agar	15 g/L

Tabla1. Composición de TSA

Preparación: Suspender 40 g en 1 l de agua destilada; mezclar bien y calentar ligeramente hasta disolución total. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos. A continuación se atempera en un baño de 50°C aproximadamente, para que el agar se encuentre en las condiciones correctas y las placas tengan la solidez adecuada para sembrar. Y verter en placas Petri estériles.

- Medio Vogel Johnson agar

El Agar Vogel-Johnson es un medio sólido altamente selectivo para el aislamiento y la identificación de *Estafilococos* manitol-positivos. Los componentes son los siguientes:

Tripteína	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Manitol	10 g/L
Fosfato dipotásico	5 g/L
Cloruro de litio	5 g/L
Glicina	10 g/L
Rojo de fenol	0.025 g/L
Agar	16 g/L
pH final 7,2 ±0,2	

Tabla 2. Composición de VJ agar

Preparación: Suspender 60 g en 1 l de agua destilada; mezclar bien y calentar ligeramente hasta disolución total. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos. A continuación se atempera en un baño de 50°C aproximadamente, para que el agar se encuentre en las condiciones correctas y las placas tengan la solidez adecuada para sembrar. A continuación añadir 6 ml de Telurito potásico al 3,5% estéril, por litro de medio. Y verter en placas Petri estériles.

- Medio Palcam agar

Medio de cultivo, que con el agregado de antimicrobianos, permite el cultivo y aislamiento selectivo de *Listeria* spp. Su composición es la siguiente:

Columbia Agar Base	39 g/L
D-Glucosa	0.5 g/L
D-Manitol	10 g/L
Esculina	0.8 g/L
Citrato de Hierro y amonio	0,5 g/L
Rojo fenol	0.08 g/L
Cloruro de litio	15 g/L
pH final: 7.2 ± 0,2	

Tabla 3. Composición de Palcam

Preparación: Suspender 69 g en 1 l de agua destilada; mezclar bien y calentar ligeramente hasta disolución total. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos. A continuación se atempera en un baño de 50°C aproximadamente, para que el agar se encuentre en las condiciones correctas y las placas tengan la solidez adecuada para sembrar. A continuación añadir 2 ml del suplemento de *Listeria*. Y verter en placas Petri estériles.

- Medio Eosina –Azul de metileno (E.M.B.)

Este medio es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. Permite el desarrollo de todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae*. Su composición es la siguiente:

Peptona	10 g/L
Lactosa	5 g/L
Sacarosa	5 g/L
Fosfato dipotásico	2 g/L
Agar	13,5 g/L
Eosina	0,4 g/L

Azul de metileno	0,065 g/L
pH final: 7.2 ± 0,2	

Tabla 4. Composición de EMB

Preparación: Suspender 36 g en 1 l de agua destilada; mezclar bien y calentar ligeramente hasta disolución total. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos. A continuación se atempera en un baño de 50°C aproximadamente, para que el agar se encuentre en las condiciones correctas y las placas tengan la solidez adecuada para embrar. Y verter en placas Petri estériles.

- Medio Kanamicina-Esculina-Azida (KAA) Agar

Se emplea para la detección, aislamiento y confirmación de Enterococos en alimentos, aguas y otras muestras biológicas. Su composición es la siguiente:

Tryptone	20 g/L
Ammonium Ferric Citrate	0,50 g/L
Yeast Extract	5 g/L
Sodium Azide	0,15 g/L
Sodium Chloride	5 g/L
Kanamycin Sulfate	0,020 g/L
Sodium Citrate	1 g/L
Bacteriological Agar	15 g/L
Esculin	1 g/L
pH final: 7.2 ± 0,2	

Tabla 5. Composición de KAA

Preparación: Suspender 48 g en 1 l de agua destilada; mezclar bien y calentar ligeramente hasta disolución total. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos. A continuación se atempera en un baño de 50°C aproximadamente, para que el agar se encuentre en las condiciones

correctas y las placas tengan la solidez adecuada para sembrar. Y verter en placas Petri estériles.

- Medio Agar Manitol Extracto de Levadura (YMA)

Es un medio de cultivo específico para el crecimiento de levaduras.

Sus componentes son los siguientes:

Manitol	10 g/L
Extracto de levadura	4 g/L
K ₂ PHO ₄	0,5 g/L
M _g SO ₄	0,2 g/L
NaCl	0,1 g/L
Agar	15 g/L
Rojo Congo	202,5 g/L
pH final: 7.2 ± 0,2	

Tabla 6. Composición de YMA

Preparación: Suspender 21 g en 1 l de agua destilada; mezclar bien y calentar ligeramente hasta disolución total. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos. A continuación se atempera en un baño de 50°C aproximadamente, para que el agar se encuentre en las condiciones correctas y las placas tengan la solidez adecuada para sembrar.

- Medio Xilosa, Lisina, Desoxicolato (XLD)

Es un medio selectivo diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de patógenos entéricos. Gram negativos, especialmente del género *Salmonella*. Su composición es la siguiente:

Peptona	1 g/L
Extracto de levadura	2 g/L
Lactosa	7,5 g/L
Sucrosa	7,5 g/L

Xilosa	3,75 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
L-Lisina	5 g/L
Trisulfato de sodio	4,34 g/L
Citrato fémico de amonio	0,8 g/L
Desoxicolato de sodio	1 g/L
Rojo de fenol	0,072 g/L
Agar A	15 g/L
pH final: 7.3 ± 0,2	

Tabla 7. Composición de XLD

Preparación: Suspender 57 g en 1 l de agua destilada; mezclar vigorosamente. Calentar con agitación suave hasta que el medio llegue a ebullición (hasta que queden las paredes del matraz transparentes). Evitar el sobrecalentamiento ya que puede provocar la precipitación del medio. Este medio no se puede esterilizar por autoclave. Enfriar en un baño a una temperatura de unos 50°C aproximadamente. Y verter en placas Petri estériles.

- Solución salina al 85%
Cloruro sódico + Agua destilada (0,85 g en 100 ml de H₂O destilada)

3.3. Material de laboratorio empleado.

- Matraces estériles de diferentes tamaños.
- Alcohol de 96°.
- Guantes.
- Placas de Petri estériles.
- Pipetas de 1000 µl y 100 µl
- Asas de siembra.

- Mechero Bunsen.
- Estufa de cultivo a 37°C y 30°C.
- Baño de agua a 50°C.
- Tubos eppendorf.
- Puntas estériles para micropipetas.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Agua destilada.
- Lugol.
- Cristal violeta.
- Safranina.
- Peróxido de hidrógeno.
- Microscopio.

3.4. Determinación de la carga microbiana total y de patógenos

En primer lugar preparamos seis bolsas de stomacher, a cada una de ellas, le añadimos 5 g del alimento y 45 ml de solución salina estéril (muestra madre), previamente esterilizada. Esto se realizó cerca del mechero Bunsen para la máxima esterilidad. Una vez que tenemos preparadas las seis bolsas las cerramos herméticamente y se meten en el stomacher para una homogeneización rápida de los alimentos. A continuación procedimos a preparar las diluciones seriadas de la muestra de alimentos a partir de la muestra madre hasta la dilución -8.

He utilizado aproximadamente 34 tubos eppendorf con 900 µl de solución salina cada uno. Partimos de que la muestra de alimento que se encuentra en la bolsa de stomacher es la solución madre y está diluida 10^{-1} . Tomamos de esa bolsa 100 µl y lo añadimos a nuestro tubo eppendorf, lo agitamos en el vortex y esa será nuestra dilución 10^{-2} , así sucesivamente hasta llegar a la dilución correspondiente necesaria para cada muestra de alimento.

Todos los procesos que hagamos en microbiología deben realizarse en el mechero Bunsen para evitar la contaminación de las muestras. Además, todo el material debe estar esterilizado previamente.

Una vez obtenidas todas las diluciones de nuestras muestras, lo que se debe hacer es inocular las diluciones de los alimentos en placas Petri con los diferentes medios. Para inocularlas debemos añadir 100 µl en cada una de ellas y con un asa de siembra (metida en un bote con alcohol 96º) flameamos y se extiende la muestra sobre su superficie. Hay que realizar dos placas por cada dilución para obtener la media de los recuentos. Una vez hecho este proceso con todas las placas, debemos dejarlas incubar en la estufa a 37°C durante 48 horas todas excepto las sembradas en YMA que se incuban a 30°C en la estufa. Las placas se deben colocar con la base hacia arriba.

Haremos un recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 48 horas de su incubación que nos permitirá conocer el número de células viables existentes en el alimento analizado.

3.5. Tinción diferencial de Gram

La tinción de Gram es la técnica utilizada hoy en día en los laboratorios de bacteriología para el examen microscópico de las bacterias. Es tan importante, porque nos permite diferenciar por su estructura y grosor de la pared bacteriana, bacterias Gram positivas y Gram negativas. Revela la forma de la bacteria, agrupación y grupo taxonómico al que pertenece. Las bacterias Gram positivas poseen una gruesa pared de peptidoglicano y no tienen membrana externa. Sin embargo, las bacterias Gram negativas tienen una capa más delgada de peptidoglicano y sí poseen membrana externa, además poseen un alto contenido en lípidos.

Casi todas las bacterias que tienen importancia clínica pueden detectarse con este procedimiento, excepto los microorganismos que se hallan en exclusividad dentro de las células huésped.

El procedimiento de esta técnica consiste en extender y fijar la célula viable a la superficie del portaobjetos con una gota de agua destilada por calor. Se debe secar y dejar enfriar. Después el paso que se lleva a cabo es aplicar el colorante cristal violeta que se deja actuar durante dos minutos. Pasado este tiempo escurrimos el sobrenadante y añadimos

Lugol, también durante dos minutos. Es un agente mordiente yodado que nos permite que se fije la coloración anterior a la pared celular. Posteriormente quitamos el sobrenadante y lavamos con agua destilada. A continuación procedemos a la decoloración o deshidratación con etanol durante 30 segundos; así conseguimos que los microorganismos Gram positivos retengan el cristal violeta y los Gram negativos lo pierdan. Lavamos el portaobjetos con agua destilada para quitar el exceso de alcohol. Añadimos safranina como colorante de contraste durante 2-3 minutos para teñir de color rosa o rojo las bacterias Gram negativas claras.

Para finalizar esta técnica lavamos, secamos y pasamos a la observación en el microscópico con el objetivo de 100X con ayuda de aceite de inmersión.

Hay que tener en cuenta que una excesiva decoloración puede influir en que las bacterias Gram positivas se observen rosadas y no violetas. Además se debe prestar atención a los lavados que se deben realizar al ir añadiendo los diferentes reactivos de tinción, ya que si se deja un exceso de agua en la lámina los reactivos se diluirán y no producirán la tinción correctamente.

4. RESULTADOS

4.1. Determinación de la carga microbiana

Conteo de colonias de los diferentes medios de cultivo empleados, mediante el empleo de la siguiente fórmula.

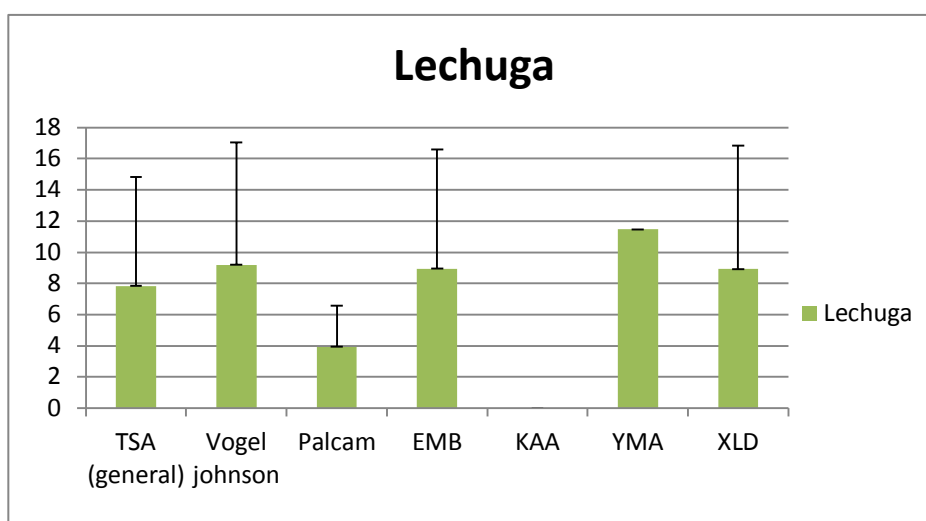
$$\frac{UFC}{ml} = \frac{Colonias}{\mu l \text{ en placa } \times \text{ factor de dilución}}$$

A continuación podemos observar una tabla con los resultados obtenidos:

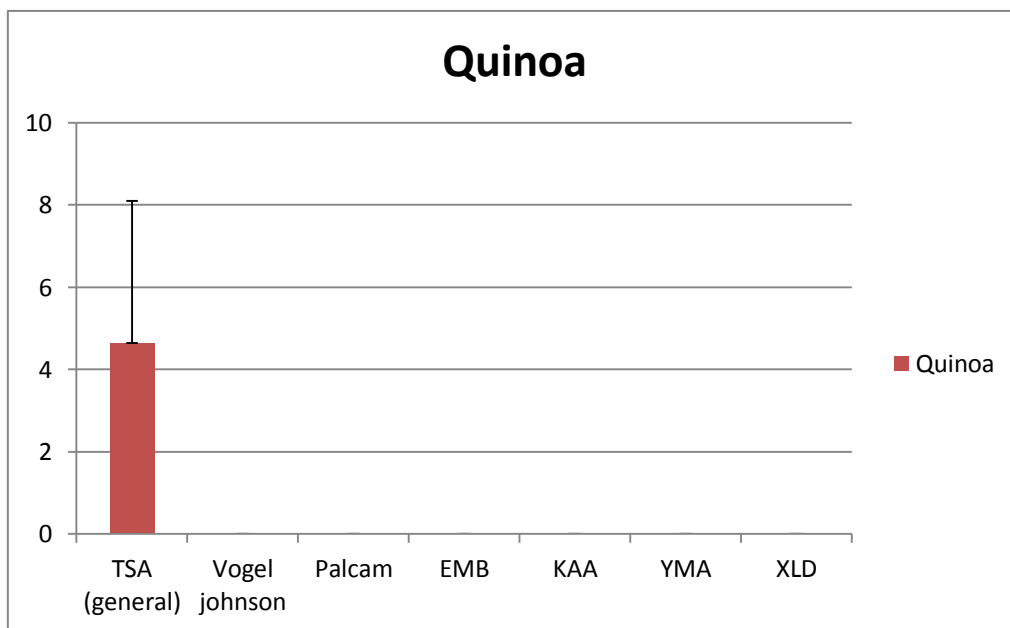
Medios de cultivo	Recuentos en UFC/ ml de los diferentes alimentos					
	Lechuga	Quinoa	E.Rusa	Cangrejo	Pollo	Arroz con leche
TSA	7×10^7	$4,4 \times 10^4$	0	$1,2 \times 10^3$	4×10^{10}	$3,6 \times 10^7$
Vogel Johnson	$1,56 \times 10^9$	0	0	0	2×10^9	$6,5 \times 10^7$
Palcam	$8,7 \times 10^3$	0	0	0	$2,5 \times 10^9$	$3,6 \times 10^3$
EMB	9×10^8	0	0	0	$1,93 \times 10^{10}$	5×10^3
KAA	0	0	0	0	$6,7 \times 10^4$	6×10^2
YMA	3×10^{11}	0	0	0	3×10^{11}	6×10^2
XLD	$8,4 \times 10^8$	0	0	0	$1,23 \times 10^{10}$	$7,4 \times 10^3$

Tabla 8. Tabla resumen de UFC/ ml de la carga microbiana de cada alimento en los diferente medios de cultivo empleados.

Podemos ver la gráfica correspondiente a cada alimento, excepto la de la ensaladilla rusa ya que todos los valores obtenidos han sido 0.



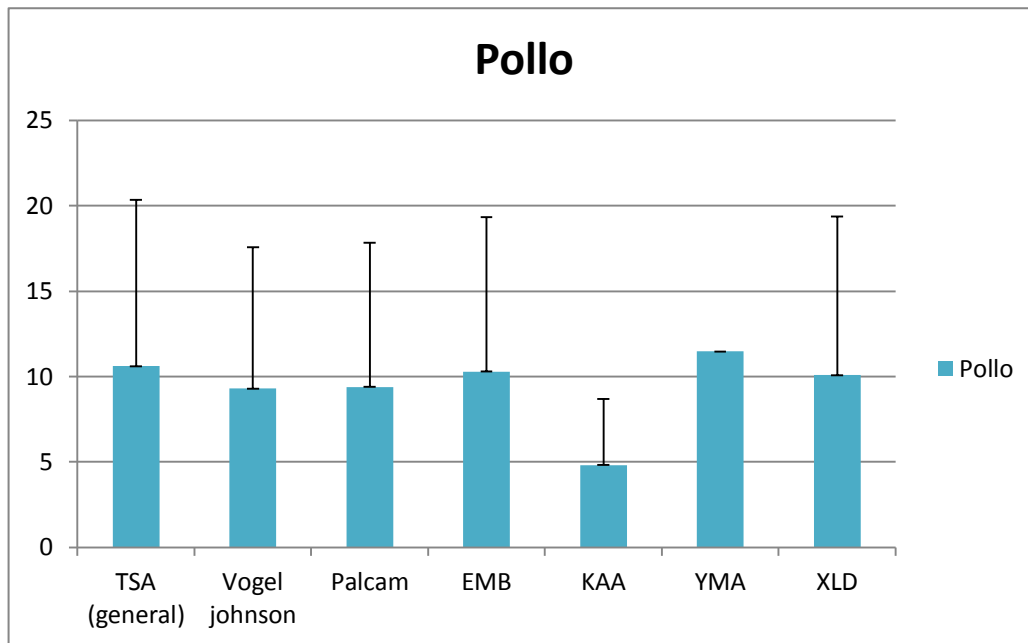
Gráfica 1. Microbiota de lechuga en los distintos medios de cultivo.



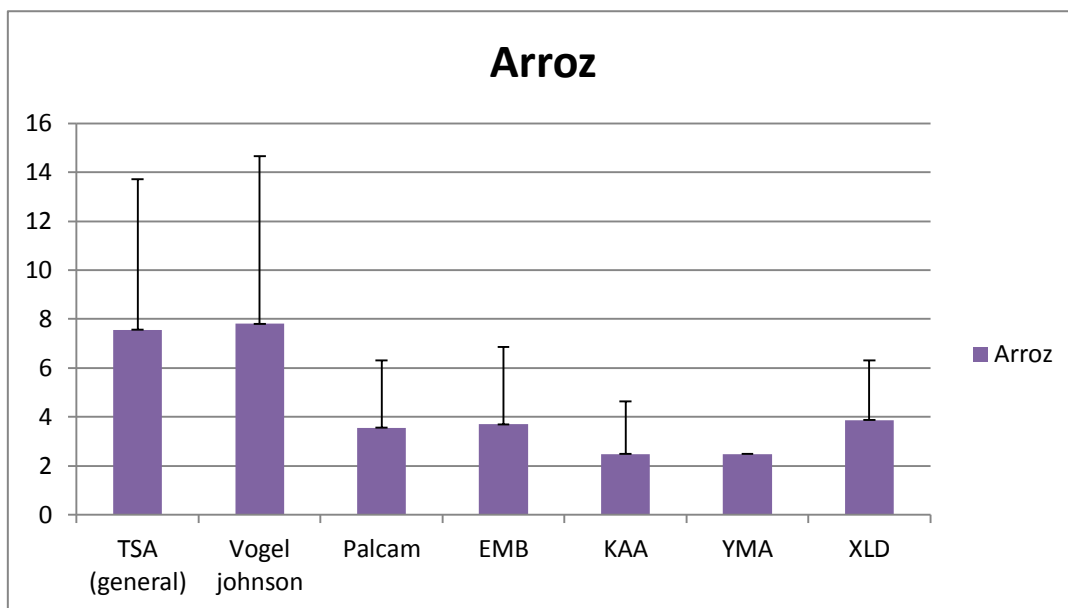
Gráfica 2. Microbiota de quinoa en los distintos medios de cultivo.



Gráfica 3. Microbiota de ensaladilla de cangrejo en los distintos medios de cultivo.



Gráfica 4. Microbiota de pollo villaroy en los distintos medios de cultivo.



Gráfica 5. Microbiota de arroz con leche en los distintos medios de cultivo.

4.2. Detección de patógenos presentes en cada alimento

Las colonias de *Staphylococcus aureus* se detectaron en los siguientes alimentos: lechuga, pollo villaroy y arroz con leche. En mayor cantidad se encuentra en pollo villaroy. A continuación podemos ver la foto obtenida de las bacterias observadas al microscopio óptico.

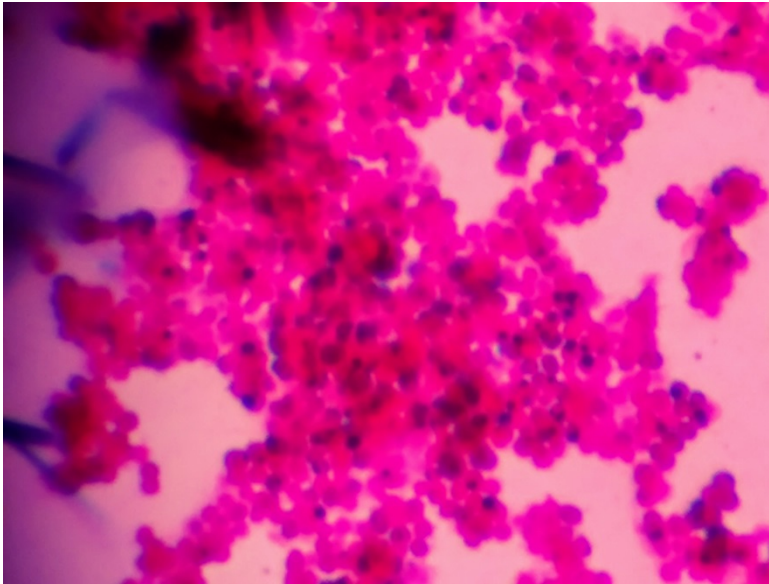


Fig.3. *Staphylococcus aureus* obtenida mediante tinción de Gram y microscopía óptica x1000.

En la imagen podemos apreciar cocos Gram positivos dispuestos en racimo.

En cuanto a *Listeria monocytogenes* fue hallada en los siguientes alimentos: lechuga, pollo villaroy y arroz con leche. En mayor cantidad se encuentra en pollo villaroy. Seguidamente podemos ver la foto obtenida de las bacterias observadas al microscopio óptico.



Fig.4. *Listeria monocytogenes* obtenida mediante tinción de Gram y microscopía óptica x1000.

En la imagen se aprecian bacilos pequeños rectos o un poco curvados.

Las Enterobacterias han sido detectadas en los siguientes alimentos: lechuga, pollo villaroy y arroz con leche. En mayor cantidad se encuentra en pollo villaroy. Después podemos ver la foto obtenida de las bacterias observadas al microscopio óptico.

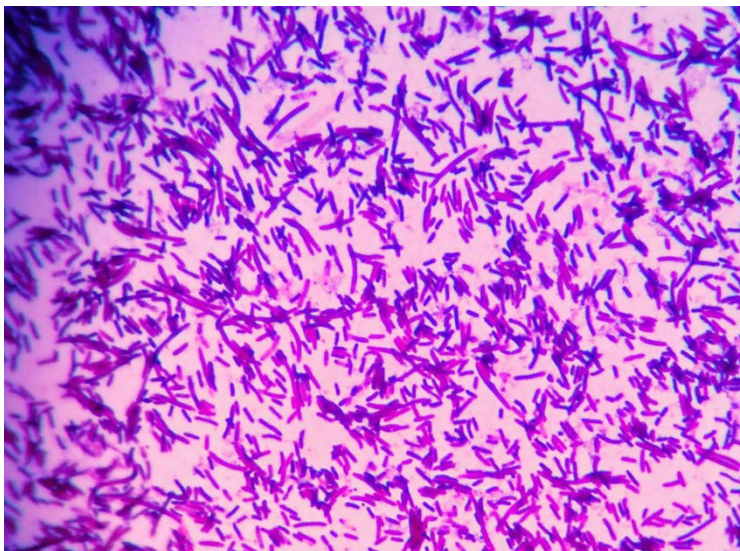


Fig.4. Enterobacterias obtenidas mediante tinción de Gram y microscopía óptica x1000.

En la imagen se aprecian bacilos pequeños rectos o un poco curvados.

Para los Enterococos, éstos han sido presentes en los siguientes alimentos: pollo villaroy y arroz con leche. En mayor cantidad se encuentra en pollo villaroy. A continuación podemos ver la foto obtenida de las bacterias observadas al microscopio óptico.

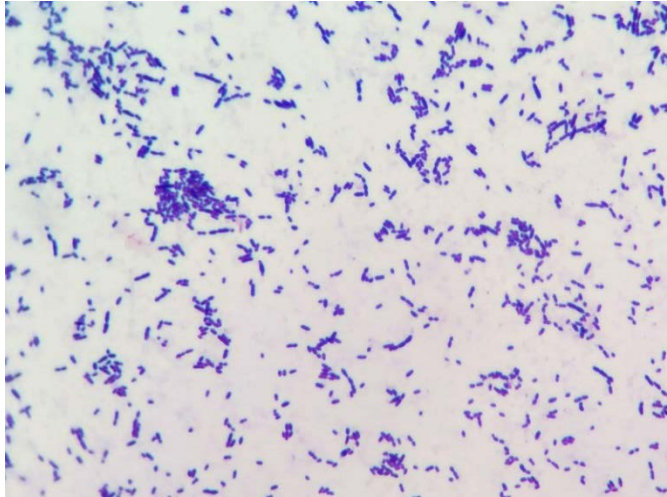


Fig.5. Enterococos obtenidos mediante tinción de Gram y microscopía óptica x1000.

En la imagen podemos ver cocos aislados, en parejas o cadenas cortas.

Las Levaduras se detectaron en los siguientes alimentos: lechuga, pollo villaroy y arroz con leche. En mayor cantidad se encuentra en pollo villaroy y lechuga. Seguidamente podemos ver la foto obtenida de las levaduras observadas al microscopio óptico.

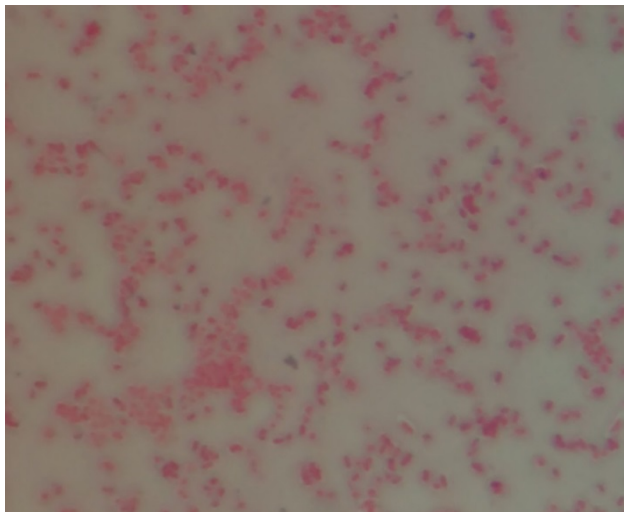


Fig.5. Levaduras obtenidas mediante tinción de Gram y microscopía óptica x1000.

En la imagen podemos ver hongos con formas redondas.

Las colonias de *Salmonella* han sido detectadas en los siguientes alimentos: lechuga, pollo villaroy y arroz con leche. En mayor cantidad se encuentra en lechuga. A continuación podemos ver la foto obtenida de las bacterias observadas al microscopio óptico.

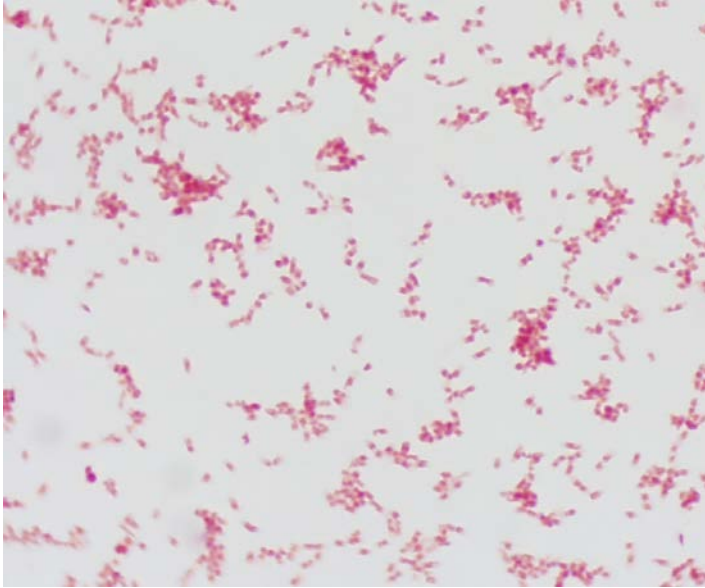


Fig.5. *Salmonella* obtenida mediante tinción de Gram y microscopía óptica x1000.

En la imagen podemos apreciar bacilos.

5. DISCUSIÓN

Intoxicaciones producidas por altas cantidades de bacterias en alimentos listos para consumo (en este caso nos centraremos en las aparecidas en pollo villaroy, lechuga y arroz con leche porque son los que presentan valores más elevados).

En el caso de la presencia de *Staphylococcus aureus* en grandes cantidades en el alimento, puede producirse debido a que la persona que manipula el alimento lo hace en condiciones higiénicas deficientes ya que esta bacteria se encuentra como parte de la microbiota comensal de la piel. Además dicha persona manipuladora del alimento puede presentar infecciones en la piel y así puede contaminar estos alimentos poco cocinados o también cuando estos alimentos se dejan a temperatura ambiente pueden experimentar el crecimiento de dicha bacteria. Según un estudio realizado en México en el Laboratorio Nacional de Salud Pública, este patógeno ha causado 792 hospitalizaciones y 5 muertes (Mota y Fernández, 1989).

En cuanto a la presencia de *Listeria monocytogenes* en cantidades elevadas en el alimento, según un estudio realizado en 2017 por el Servicio de Seguridad e Inspección de Alimentos se debe principalmente a los protocolos de limpieza que no eliminan por completo la bacteria (UnsafeFoods, 2017). Se conoce también una muerte por *Listeria monocytogenes* causada por el consumo de ensalada y 11 hospitalizaciones según informan los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) (Christensen, 2016).

Según un artículo publicado en El País se han producido intoxicaciones por la presencia de *Escherichia coli* (Enterobacteria) tras la ingesta de carne, en este caso el acontecimiento ocurrió en Francia produciendo la hospitalización de 7 niños. Esta enfermedad produce insuficiencia renal aguda y un gran descenso del nivel de plaquetas (Jiménez, 2011). Generalmente esta intoxicación se produce por una mala higienización o una contaminación de los utensilios utilizados para su preparación.

En el caso de enterococos, las principales causas por las que se puede producir una intoxicación son: deficientes prácticas de higiene, cocción inadecuada de los alimentos y contaminación cruzada cuando los alimentos cocidos entran en contacto con alimentos crudos o materiales contaminados.

En el caso de las Levaduras son transmitidas por las personas, el equipo, los alimentos y las corrientes de aire. Las levaduras dañan, es decir perjudican su calidad, pero no producen enfermedades.

Según un artículo publicado por Reyes en 2012, se hospitalizaron 375 personas intoxicadas por *Salmonella*, en este caso los alimentos pueden haberse contaminado durante la preparación. La infección se da cuando se entra en contacto con las heces de animales o humanos infectados (Reyes, 2012).

En resumen, la mejor manera de prevenir enfermedades transmitidas por alimentos es siguiendo unas reglas de higiene de los alimentos que:

Promuevan buena higiene personal – Permita que únicamente empleados saludables manejen la comida y asegúrese de que todos los empleados se laven las manos apropiada y frecuentemente mientras están trabajando, y manipular los alimentos con guantes.

Previengan la contaminación cruzada – Almacene los alimentos correctamente y únicamente use utensilios y superficies limpias para almacenar, preparar y servir alimentos.

Mantengan los alimentos fuera de la zona de temperatura de peligro – Cocine los alimentos a la temperatura apropiada y mantenga los alimentos potencialmente peligrosos a menos 5°C o más de 57°C.

6. CONCLUSIONES

Tras los resultados obtenidos podemos decir que tanto la lechuga, como el pollo villaroy como el arroz con leche presentan una elevada cantidad de bacterias, las cuales pueden llegar a producir intoxicaciones/infecciones muy graves, o en algunos casos aunque con menor frecuencia la muerte.

El patógeno encontrado que ha producido un mayor número de hospitalizaciones e incluso la muerte es *Staphylococcus aureus*, este patógeno se encuentra en mayores cantidades en el pollo villaroy.

El pollo villaroy es un alimento listo para el consumo encontrándose expuesto en vitrinas en supermercados, con lo cual su uso es directo. Por lo que su alto contenido en *Staphylococcus aureus* puede deberse a la falta de higiene durante la manipulación o incluso por la contaminación de los utensilios empleados.

También hay que mencionar que se han dado hospitalizaciones por la presencia de *Salmonella*, *Escherichia coli*, y *Listeria monocytogenes* en los alimentos listos para consumo, pero sin producir la muerte, salvo *Listeria monocytogenes* que ha producido la muerte de una persona.

Por lo que para reducir las hospitalizaciones o incluso la muerte producida por la presencia de bacterias en el alimento, se tendría que llevar a cabo unas correctas normas de higienización y un correcto almacenado del alimento.

7. BIBLOGRAFÍA

AGUILAR, J. 2012. *Métodos de conservación de alimentos*. Edición 1. Red tercer milenio. Estado de México.

ANMAT FEDERAL. 2011. *Análisis microbiológico de los alimentos*. Vol.1. Metodología Analítica oficial. Microorganismos patógenos. Ministerio de Salud. Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos, 3.

BANWART, G.J. 1989. *Basic Food Microbiology*. Ed.2.; Chapman & Hall; New York; 1989.

CLAYTON, K.; BUSH, D. y KEENER, K. 2008. *Métodos para la conservación de alimentos*. Departament of Food Science.

CHRISTENSEN. J. 2016. *EEUU: un muerto por brote de listeria; se sospecha de una ensalada*. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades.

DÍAZ, M.; SALAS, C.C.; FERNANDEZ, M.T. y MARTÍNEZ, A. 2007. *Características clínicas y epidemiológicas de las infecciones por enterococos en el niño*. Vol. 79. Hospital pediátrico universitario. Revista Cubana de Pediatría. Ciudad de la Habana.

EACEA (Educación y Cultura Programa de Aprendizaje, LEONARDO DA VINCI) .2006. *Microorganismos y alimentos*, food quality.

(FAO) y (OMS), 2004. *Caracterización de peligros de patógenos en los alimentos y el agua*, Roma.

GARCÍA, E.; GAGO, L. y FERNÁNDEZ, J.L. 2006. *Tecnologías de envasado de atmósfera protectora*. Informe de vigilancia tecnológica.

HERRERA, L. y TROYO, J. 2011. *Conceptos Básicos para la Manipulación de alimentos*. Instituto nacional de aprendizaje, Alajuela (Costa Rica).

HILLAN, J. y SIMONNE, A. 2016. *Seguridad Alimentaria: Alimentos listos para comer*. Departamento de Ciencias de la Familia, la Juventud y la Comunidad,

Servicio de Extensión Cooperativa de la Florida, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, Universidad de la Florida.

IBÁÑEZ, F.; TORRE, P. y IRIGOYEN, A. 2003. Aditivos alimentarios. Área de Nutrición y Bromatología. Universidad Pública de Navarra.

ISPSA, Instituto de Salud Pública Seguridad Alimentaria. 2011. *Guía de muestreo e interpretación de resultados analíticos de productos alimenticios*. Edición 1. Madrid.

JANG,S.;EUIYOUNG, C.; KISEON, H.; TAKAHISA,M.; SUNGGI, H y SANGRYEOL,R. 2006. *Resistencia Antibiótica y Diversidad Genética de Listeria monocytogenes aisladas de canales de pollo en Corea*. Revista de microbiología y biotecnología.

JIMÉNEZ. A. 2011.*Hospitalizaciones por 'E.coli' siete niños franceses tras comer carne*. País.

JULIARENA , P. y GRATTON, R. 2006. *Conservación de los alimentos*. Tecnología, ambiente y sociedad. UNICEN.

LÓPEZ, R.;TORRES, T. y ANTOLÍN, G. 2010. Tecnología de Envasado y Conservación de Alimentos. *Laboratorio de Procesos Químicos de CARTIF, Valladolid*.

MARTIN, R. y MAURICE.O. 2008. Microbiología de los alimentos. *La Sociedad Real de Química*. Ed. 3. University of Surrey, Guildford, UK.

MOTA, L y FERNÁNDEZ, E.1989. *Intoxicación estafilocócica por alimentos*. Laboratorio Nacional de Salud Pública. México.

ORDÓÑEZ, J.A. ; CAMBERO, I. ; CABEZA, M.C. y DE LA HOZ, L. 2007. *Higienización de alimentos listos para su consumo (RTE) mediante radiaciones ionizantes*. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense. 28040-Madrid.

PÉREZ, I. 2012. *Bacillus cereus y su papel en las intoxicaciones alimentarias*. Revista Cubana de Salud pública. 98-108.

PORTE, L.; HERVE, B. y CHANQUEO, L. 2007. *Enterococcus sp.* Parte I. Revista Chilena de Infectología. Santiago, junio.

PUERTA, A. y MATEOS-RODRÍGUEZ.F. 2006. *Enterobacterias. Enfermedades infecciosas.* Servicio de medicina interna. Complejo Hospitalario Universitario de Albacete. Albacete.

REYES. L. 2012. *Salmonella y estafilococo causa de intoxicación de 317 niños en Guerrero.*México.

RODRÍGUEZ, C.; DÍAZ, M. y ZHURBENKO, R. 2010. *Aspectos fundamentales sobre el género Enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad.* Revista Cubana de Higiene y Espidemiología.

SÁNCHEZ, J. 2011. *Listeria monocytigenes: un reto para la seguridad alimentaria.* Laboratorio de salud pública de Salamanca.

SÁNCHEZ, J.; CORREA, M. y CASTAÑEDA –SANDOVAL, L. 2016. *Bacillus cereus un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos.* Vol. 34. Revista Facultad Nacional. 230-242. Medellín, Colombia.

UNSAFEFOODS. 2017. *Intoxicación por Listeria en alimentos procesados.* Servicio de Seguridad e Inspección de Alimentos. Estados Unidos.

USDA, Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos. 2010. *La refrigeración y la inocuidad de los alimentos.* Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

ZENDEJAS-MANZO, G.S.; ÁVALOS-FLORES, H. y SOTO-PADILLA, M.Y. 2014. *Microbiología general de Staphylococcus aureus: generalidades, patogenicidad y métodos de identificación.* Universidad de la Ciénaga del Estado de Michoacán. 129-143. Ocampo, México.

Páginas web:

<http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/65372-intoxicacion-estafilococica-alimentos>

<http://www.unsafefoods.com/2017/01/29/intoxicacion-por-listeria-en-alimentos-procesados-dions/?lang=es>

http://elpais.com/diario/2011/06/17/sociedad/1308261603_850215.html

<http://expansion.mx/nacional/2012/05/02/salmonela-y-estafilococo-causa-de-intoxicacion-de-317-ninos-en-guerrero>

<http://cnnespanol.cnn.com/2016/01/24/ee-uu-un-muerto-por-brote-de-listeria-se-sospecha-de-una-ensalada/>