

Trabajo de Tesis de Grado para optar al título de MICROBIÓLOGA, bajo la dirección de Mg. Daniela Lombardo y la co-dirección de la Dra. Susana Bettera. Realizado en la Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos.

Tesista

Sara Judith Pena

Directora

Mg. Daniela Lombardo

Co-Directora

Dra. Susana Bettera

Miembros del Jurado

Mg. Daniela Lombardo

Dra. Cecilia Farnochi

Dra. Noemí Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la Universidad Nacional de Río Cuarto que me permitió estudiar.
- ❖ A mis profesoras Susana, Cecilia y Daniela que me brindaron sus conocimientos, su tiempo, su dedicación y me dieron la posibilidad de tener diversas experiencias que me permitieron crecer como profesional pero también como persona.
- ❖ A mis compañeras del laboratorio Estefanía, Eugenia, Laura y Mariana, personas que ayudaron en mi formación, desempeño y con las que he compartido el día a día.
- ❖ A todos los profesores de la carrera que me dedicaron su tiempo y sus conocimientos.
- ❖ A mis padres Judith y Jorge, por brindarme la posibilidad de estudiar y apoyarme en cada momento de la carrera.
- ❖ A mis hermanos, Cristian y Pilar, que me acompañaron en este nuevo desafío.
- ❖ A mis abuelos, tíos, primos y a toda mi familia que siempre tuvieron una palabra de aliento.
- ❖ A mis amigos de la universidad Pame, Romi, Male, Maca y Dario por compartir momentos inolvidables en estos años, por darme su amistad y por permitirme recorrer este camino juntos.
- ❖ A mis amigas de siempre Dai, Gabu y Stefi por compartir este momento, animarme y por darme esta amistad verdadera.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción

1.1 La importancia de la alimentación.....	1
1.2 Contaminación de los alimentos	3
1.3 Microorganismos presentes en alimentos	6
1.4 Enfermedades transmitidas por los alimentos.....	6
1.4.1 Microorganismos que producen enfermedades de transmisión alimentaria	8
1.5 Microorganismos marcadores.....	12
1.6 Seguridad alimentaria	15
1.6.1 Buenas Prácticas de Manufactura.....	17
1.6.2 Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento	20
1.6.3 Manejo Integrado de Plagas	21
1.7 Biofilms.....	22
1.8 Comidas preparadas. Normativa.....	23

2. Hipótesis

3. Objetivos

3.1 Objetivo general:.....	30
3.2 Objetivos específicos:	30

4. Materiales y métodos

4.1 Toma de muestras.....	31
4.2 Análisis microbiológico de alimentos.....	36
4.2.1 <i>Preparación del homogenato o suspensión inicial y las diluciones sucesivas de las muestras. Metodología analítica ICMSF: 2000.....</i>	<i>37</i>
4.2.2 <i>Recuento de enterobacterias. Metodología analítica: ISO 21528-2:2004.....</i>	<i>37</i>
4.2.3 <i>Recuento de Escherichia coli. Metodología analítica: ICMSF 2000. Adaptación Método 2: Europeo.....</i>	<i>37</i>
4.2.4 <i>Recuento de Staphylococcus aureus. Metodología analítica: ISO 6888-3:2003. Corrección 2004</i>	<i>38</i>
4.2.5 <i>Determinación de Salmonella spp. Metodología analítica: ISO 6579:2002.....</i>	<i>38</i>

4.2.6 Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> . Metodología analítica: Adaptación APHA:1992...	39
4.2.7 Recuento de <i>Bacillus cereus</i> . Metodología analítica: ISO 7932:2004.....	39
4.2.8 Determinación de <i>Escherichia coli</i> en 10 g de muestra. Metodología analítica: Adaptación ICMSF:2000.....	39
4.3 Análisis microbiológico de ambiente	40
4.3.1 Método del hisopo. Metodología analítica: ISO 18593:2004.....	40
4.3.2 Método del enjuague	40
4.3.3 Método por contacto directo.....	40
4.3.4 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales. Metodología Analítica ISO 4833-1:2003.....	41
4.3.5 Recuento de enterobacterias. Metodología analítica: ISO 21528-2:2004.....	41
4.3.6 Recuento de coliformes totales. Metodología analítica: ISO 4832:2006.....	41
4.3.7 Recuento de hongos y levaduras.....	41
4.3.8 Investigación de <i>Escherichia coli</i> en 1 g o ml de muestra. Metodología analítica adaptación ICMSF 2000.....	42
4.4 Análisis de datos.....	42
5. Resultados y discusión	
5.1 Análisis microbiológico de comidas preparadas listas para el consumo.....	43
5.1.1 Alimentos listos para el consumo elaborados en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto	43
5.1.2 Alimentos listos para el consumo elaborados por empresas de la ciudad de Río Cuarto y región.....	45
5.2 Evaluación total de muestras analizadas listas para el consumo expendidas en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto.....	53
5.3 Análisis microbiológico de muestras ambientales	58
5.3.1 Análisis microbiológico de superficies inertes del comedor de la UNRC	58
5.3.2 Análisis microbiológico de superficies vivas del comedor de la UNRC	63
5.3.3 Análisis microbiológico del ambiente del comedor de la UNRC	66

6. Conclusiones

6.1 Recomendaciones73

7. Anexo

7.1 Medios de cultivo74

7.2 Adicionales de medios de cultivo, soluciones y otros materiales.....83

7.3 Reactivos.....84

8. Bibliografía

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Especificaciones microbiológicas para comidas preparadas según ítems I, II y III.....	24
Tabla 2: Especificaciones microbiológicas para comidas preparadas según ítem IV.....	25
Figura 1: Plano del comedor universitario.....	28
Tabla 3: Alimentos elaborados en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto.....	32
Tabla 4: Alimentos elaborados en distintas empresas de la Ciudad de Río Cuarto.....	32
Tabla 5: Materias primas proporcionadas por la empresa 7 y comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto.....	34
Tabla 6: Superficies inertes muestreadas por el método del hisopo en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en noviembre de 2016.....	34
Tabla 7: Superficies vivas muestreadas por el método del hisopo en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en noviembre de 2016.....	34
Tabla 8: Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en operarios del comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en noviembre de 2016.....	35
Tabla 9: Determinación de Hongos y Levaduras en el ambiente del comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en noviembre de 2016.....	35
Tabla 10: Superficies inertes muestreadas por el método del hisopo en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en junio de 2017.....	35
Tabla 11: Superficies vivas muestreadas por el método del hisopo en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en junio de 2017.....	36
Tabla 12: Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en operarios del comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en junio de 2017.....	36
Tabla 13: Determinación de Hongos y Levaduras en el ambiente del comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en junio de 2017.....	36
Tabla 14: Análisis microbiológico de productos elaborados por el comedor de la UNRC.....	44
Tabla 15: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 1.....	45
Tabla 16: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 2.....	46
Tabla 17: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 3.....	47
Tabla 18: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 4.....	47

Tabla 19: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 5.....	48
Tabla 20: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 6.....	49
Tabla 21: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 7.....	50
Tabla 22: Análisis microbiológico de materias primas y muestras enviadas por la E7.....	50
Tabla 23: Análisis microbiológico de materia prima y muestra enviadas por la E7.....	51
Tabla 24: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 8.....	52
Figura 2: Aptitud de consumo humano del total de muestras elaboradas por las ocho empresas analizadas.....	53
Figura 3: Aptitud de consumo humano del total de muestras elaboradas por las ocho empresas y por el comedor universitario.....	54
Figura 4: Porcentaje de muestras que superaron los límites establecidos para distintos marcadores.....	54
Figura 5: Número de muestras de las distintas empresas y comedor universitario que superaron los límites establecidos para diferentes determinaciones microbiológicas.....	56
Tabla 25: Análisis microbiológico de superficies inertes del comedor universitario por método de hisopado (noviembre 2016)	59
Tabla 26: Análisis microbiológico de superficies inertes del comedor universitario por método de hisopado (junio 2017)	60
Figura 6: Porcentaje de detección de los indicadores en superficies inertes antes y después del proceso de limpieza y sanitización en el año 2016.....	61
Figura 7: Porcentaje de detección de los indicadores en superficies inertes antes y después del proceso de limpieza y sanitización en el año 2017.....	61
Tabla 27: Análisis microbiológico de superficies vivas del comedor universitario por método de hisopado - Año 2016.....	63
Tabla 28: Análisis microbiológico de superficies vivas del comedor universitario por método de hisopado – Año 2017.....	64
Tabla 29: Determinación de la presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en manos de operarios del comedor universitario - Año 2016.....	65
Tabla 30: Determinación de la presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en manos de operarios del comedor universitario - Año 2017.....	65
Tabla 31: Determinación de la carga fúngica del ambiente del comedor universitario - Año 2016.....	66
Tabla 32: Determinación de la carga fúngica del ambiente del comedor universitario - Año 2017.....	66
Figura 8: Número de colonias fúngicas en la Mesada lado este (debajo de ventana).....	67
Figura 9: Número de colonias fúngicas en la Mesada 2.....	68

Figura 10: Número de colonias fúngicas en la Mesada anafe central.....	68
Figura 11: Número de colonias fúngicas en la Mesada 4.....	69
Figura 12: Número de colonias fúngicas en la Mesada lado noreste (debajo de ventana).	69

Resumen

Los platos elaborados, saludables, seguros y convenientes son actualmente los más solicitados por los consumidores. El Código Alimentario Argentino define a estos alimentos de la siguiente manera: "comida elaborada, cocida o precocida que no requiere agregado de ingredientes para su consumo". Este tipo de alimentos requieren un control microbiológico estricto y constante; ya sea de la materia prima que es utilizada para su preparación, de las distintas fases en la elaboración como así también del producto terminado. El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad microbiológica de materias primas, comidas preparadas en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) y comidas elaboradas en empresas que proveen sus productos al comedor universitario. También se realizaron dos controles microbiológicos del ambiente de elaboración, superficies, utensilios y operarios. Se analizaron 67 muestras de alimentos listos para el consumo, 6 muestras de materias primas y 112 muestras se obtuvieron a partir del ambiente, superficies inertes y vivas comprendidas en el período de abril del año 2016 a julio del 2017. El análisis microbiológico de las muestras se realizó siguiendo la metodología analítica de las normas ISO, APHA e ICMSF. La toma de muestras de superficies y operarios se realizó mediante el método del hisopo, por contacto directo y método de enjuague. El ambiente fue evaluado por exposición de placas con medio de cultivo para el posible desarrollo de hongos y levaduras a diferentes tiempos. De las 22 muestras de alimentos elaboradas en el comedor de la UNRC se determinó que todas fueron aptas para el consumo humano, cumpliendo los requisitos microbiológicos establecidos. De un total de 45 muestras analizadas de alimentos elaborados por ocho empresas de la ciudad de Río Cuarto y tomadas a partir del comedor universitario, 14 fueron consideradas no aptas para el consumo humano no cumpliendo con la norma vigente por superar los límites de recuento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y/o enterobacterias. En todas las muestras de superficie analizadas en la cocina del comedor, los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos viables totales, enterobacterias y coliformes totales disminuyeron luego de la higiene y sanitización demostrando la efectividad de los métodos de limpieza. Los procesos de limpieza y sanitización aplicados al sector cocina del comedor universitario han mejorado reduciendo la carga fúngica, pero no a valores apropiados. Los operarios han logrado concientizarse de la importancia de la higiene en la preparación de alimentos a través de las capacitaciones brindadas y llevar a cabo un correcto lavado de manos, utilización de guantes y aseo de uniformes. La correcta aplicación de las Buenas Prácticas de Manufactura, la capacitación y concientización de los operarios disminuyó el riesgo de los consumidores a contraer enfermedades transmitidas por alimentos.

1.1 La importancia de la alimentación

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define la alimentación como el proceso consciente y voluntario que consiste en el acto de ingerir alimentos para satisfacer la necesidad de comer. La nutrición, en cambio, es un proceso involuntario, autónomo de la utilización de nutrientes en el organismo para convertirse en energía y cumplir sus funciones vitales (FAO, 2017).

El Código Alimentario Argentino (CAA) define como alimento a toda sustancia o mezcla de sustancias naturales o elaboradas que ingeridas por el hombre aportan a su organismo los materiales y la energía necesarios para el desarrollo de sus procesos biológicos. La designación "alimento" incluye, además, las sustancias o mezclas de sustancias que se ingieren por hábito, costumbres o como coadyuvantes, tengan o no valor nutritivo (CAAa, 09/2010).

El crecimiento poblacional/económico y la mayor integración de América Latina y el Caribe en los mercados internacionales ha ocasionado cambios en los patrones de alimentación; se observa una disminución de preparaciones culinarias tradicionales basadas en alimentos frescos, preparados y consumidos en el hogar, y una presencia y consumo cada vez mayor de productos ultraprocesados con baja densidad de nutrientes pero con alto contenido de azúcares, sodio y grasas. Este cambio en el patrón alimentario ha contribuido a la persistencia de la malnutrición en todas sus formas y a la disminución de la calidad de vida. Este escenario requiere de un análisis profundo de la sostenibilidad y pertinencia nutricional del sistema alimentario vigente; que tome en cuenta el crecimiento demográfico, las demandas que impone la vida urbana, la capacidad de compra de los hogares, la conveniencia y las preferencias culturales de la población y que proponga estrategias innovadoras que aseguren que todas las personas, en particular la población de bajos recursos y quienes viven en situación de vulnerabilidad, tengan acceso a una alimentación sana, nutritiva y suficiente durante todo el año (FAO y OPS, 2017).

El procesamiento de alimentos ha desempeñado un papel central en la evolución y la adaptación humanas, por su contribución para asegurar suministros adecuados de alimentos nutritivos y, por consiguiente, el desarrollo de las sociedades y civilizaciones, la protección de la salud y el bienestar, además del logro del bienestar social y emocional al compartir las comidas. Prácticamente todos los alimentos que se consumen en la actualidad se procesan de alguna manera. Si el procesamiento se define como el conjunto de métodos para hacer los alimentos crudos más comestibles y agradables o

para preservarlos para el consumo posterior, entonces se han procesado los alimentos a lo largo de toda historia de la humanidad (OPS y OMS, 2015).

A partir de la industrialización, en particular en la segunda mitad del siglo XX, el procesamiento de alimentos se ha desarrollado a gran velocidad y se ha transformado profundamente gracias a la ciencia de los alimentos y otros tipos de tecnología. Dicha transformación obliga a un examen riguroso del efecto que tienen todas las formas de procesamiento de alimentos sobre los sistemas y suministros de alimentos, los hábitos y patrones de alimentación y la nutrición, la salud y el bienestar (OPS y OMS, 2015).

Muchos tipos de procesamiento son indispensables, beneficiosos o inocuos, mientras que otros son perjudiciales para la salud humana. Una comprensión cabal de la importancia del procesamiento de los alimentos depende y puede derivarse de una clasificación de los suministros de alimentos y patrones de alimentación que distinga los tipos y los usos del procesamiento. Investigadores de la Universidad de São Paulo, en Brasil, han desarrollado una nueva clasificación de los alimentos de acuerdo a la naturaleza, finalidad y el grado de procesamiento. Comprende cuatro grupos que se mencionan a continuación:

1. Alimentos sin procesar o mínimamente procesados: son partes de plantas o animales que no han experimentado ningún procesamiento industrial. Los alimentos mínimamente procesados son aquellos sin procesar que se modifican por pérdida de ciertas partes de los mismos pero sin el agregado de sustancias nuevas como grasas, azúcares o sal.

2. Ingredientes culinarios procesados: son sustancias extraídas y purificadas por la industria a partir de componentes de los alimentos u obtenidas de la naturaleza (grasas, aceites, sal y azúcares).

3. Alimentos procesados: se elaboran al agregar grasas, aceites, azúcares, sal y otros ingredientes culinarios a los alimentos mínimamente procesados para hacerlos más duraderos y, por lo general, más sabrosos.

4. Productos ultraprocesados: son formulaciones industriales elaboradas a partir de sustancias derivadas de los alimentos o sintetizadas de otras fuentes orgánicas. En sus formas actuales, son inventos de la ciencia y la tecnología moderna de los alimentos industriales. La mayoría de estos productos contienen pocos alimentos enteros o ninguno. Vienen listos para consumirse o para calentar y, por lo tanto, requieren poca o ninguna preparación culinaria (OPS y OMS, 2015).

En los últimos años, el sector alimentario ha experimentado un aumento de la innovación tecnológica en correspondencia con los cambios en los estilos de vida, los

hábitos de consumo, las tendencias demográficas, etc., que han aumentado las preferencias de los consumidores por alimentos saludables, seguros y convenientes (Valero y col., 2017). Además, hoy en día el consumidor se ha vuelto mucho más consciente de la inocuidad de los alimentos como resultado de la mayor disponibilidad de información dada por los medios masivos de comunicación (Losito y col., 2017).

Otra problemática actual son los alimentos callejeros que, según la FAO, son alimentos y bebidas "listos para el consumo" preparados y vendidos, especialmente en calles y lugares públicos similares. La industria alimentaria de la calle desempeña un papel importante en las ciudades y pueblos de muchos países en desarrollo, tanto desde el punto de vista económico como para satisfacer las demandas alimentarias de los habitantes de las ciudades. Los alimentos vendidos en las calles se preparan en condiciones poco higiénicas y se muestran abiertamente, lo que conduce a un alto grado de contaminación. Por lo tanto, desde el punto de vista de la salud, la calidad microbiológica de los alimentos comercializados en la vía pública adquiere importancia, ya que ellos pueden ser una fuente importante de transmisión de enfermedades. El potencial de la contaminación de los alimentos callejeros con microorganismos patógenos ha sido bien documentado y varios brotes alimentarios se han atribuido a ellos (Sharma y Mazumdar, 2014).

Dado que Kluytmans y col. (1995) describieron el primer brote mortal de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) transmitido por los alimentos, los microbiólogos de alimentos consideran ahora la posibilidad de que los productos alimenticios sean vectores de cepas resistentes a los antimicrobianos (Castro y col., 2016). En las últimas décadas, se ha observado un aumento sustancial de la resistencia a los antibióticos por parte de los microorganismos aislados de alimentos, principalmente en los países en desarrollo debido a la automedicación y a que el público en general no es consciente de los efectos de los antibióticos (Sharma y Mazumdar, 2014; Fijałkowski y col., 2016).

1.2 Contaminación de los alimentos

La contaminación de los alimentos puede producirse en cualquiera de las etapas del proceso de producción o de distribución, aunque la responsabilidad recae principalmente en el productor. Sin embargo, una buena parte de las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son causadas por alimentos que han sido preparados o manipulados de forma incorrecta en el hogar, en establecimientos que sirven comida o en los mercados. Por lo tanto, el objetivo final de las actividades que son desarrolladas a lo largo de la cadena agroalimentaria es la obtención de alimentos

inocuos, es decir, libres de contaminantes que puedan afectar la salud del consumidor (Martí y col., 2012; OMS, 2017a).

La *contaminación* refiere a la *“presencia de un agente en un alimento o en cualquier objeto que pueda estar en contacto con el alimento. Este agente es capaz de causar enfermedad en una persona por la ingestión del alimento”*. Por su parte, la *alteración* de los alimentos es una variante que corresponde a una modificación no buscada de las características físicas, químicas y/o microbiológicas del alimento (Martí y col., 2012). Según Martí y col. (2012) y FAO, OPS y OMS (2016) existen diferentes clasificaciones de los mecanismos de contaminación:

- **Contaminación primaria o de origen:** es *“la que ocurre a nivel de la producción primaria, ya sea mediante la utilización de materias primas provenientes de animales enfermos o portadores sanos; o casos como el uso de leche conteniendo residuos de antibióticos, entre otros”*.

- **Contaminación directa:** es *“la que ocurre cuando un contaminante llega al alimento por medio de varias situaciones, como por ejemplo, a través del manipulador de alimentos, ya sea mediante las micro gotas de saliva al toser o estornudar o cuando este manipula alimentos teniendo heridas infectadas. Es lo que sucede también cuando las materias primas o los alimentos toman contacto con un producto químico e incluso cuando un cuerpo extraño se incorpora al alimento durante el proceso”*.

- **Contaminación cruzada:** es la forma que se da con mayor frecuencia. Esto es así por el hecho de que la mayoría de los contaminantes no se ven a simple vista por lo que el manipulador, sin darse cuenta, puede contaminar los alimentos y su entorno. Esta forma se puede dar en cualquier eslabón de la cadena alimentaria, incluso en el hogar (consumidor).

Se define a la contaminación cruzada como *“un mecanismo de contaminación que involucra a un elemento o alimento contaminado que transmite esa característica a otro que no lo estaba, es decir, hay un “cruzamiento” de contaminantes de un elemento o alimento a otro”*. Desde el punto de vista de la forma de transmisión, la contaminación cruzada puede ser directa e indirecta.

En el Codex Alimentarius un contaminante se define como: *“cualquier sustancia no añadida intencionalmente al alimento, que está presente en dicho alimento como resultado de la producción (incluidas las operaciones realizadas en agricultura, zootecnia y medicina veterinaria), fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento de dicho alimento o como resultado de contaminación ambiental”* (Codex Alimentarius, 2017). Estos se pueden incorporar al

alimento en cualquier eslabón de la cadena agroalimentaria y se clasifican según su origen en físicos, químicos y biológicos (Martí y col., 2012).

Dentro de la cadena alimentaria se consideran varias fuentes potenciales de contaminación, las cuales pueden ser directas (materias primas peligrosas, personal no apto) o indirectas (instalaciones, equipos y utensilios, procesos operativos, afluentes como el agua, residuos sólidos y líquidos, plagas y animales). Estas fuentes pueden llegar a contener o alojar contaminantes (Martí y col., 2012).

En el caso de los contaminantes físicos, estos pueden llegar al alimento por deficiencias en el diseño de instalaciones, equipos y utensilios, o bien por el uso de materiales inapropiados en su construcción, como así también por errores o fallas en el mantenimiento de los mismos. Por su parte, una inadecuada identificación de envases de productos químicos, los errores en la preparación o dosificación de los mismos, el incorrecto almacenamiento de estos productos, la falta de un período de espera apropiado después de un tratamiento médico veterinario y la utilización de materias primas contaminadas con micotoxinas, son algunas de las causas más frecuentes de la contaminación química. Los contaminantes biológicos pueden llegar a los alimentos a través de la piel y mucosas del manipulador de alimentos o a través de su saliva, por medio de su indumentaria, a través de los equipos y utensilios utilizados en la preparación de los alimentos, por medio de las superficies en contacto con la piel de los manipuladores o con los alimentos, tales como cuchillos, tablas, mesadas, bandejas y envases, entre otros (Martí y col., 2012).

Los contaminantes se pueden incorporar por error, falla o en forma accidental, en cualquiera de los eslabones de la cadena alimentaria. Según Martí y col (2012) las fallas más frecuentes son:

- Uso común de equipamiento o utensilios para la elaboración o preparación de alimentos, tomando contacto con materias primas/productos en diferentes estadios de un proceso, sin haberlos limpiado y desinfectado previamente al uso.
- Almacenamiento conjunto de productos de diferente origen o estado de procesamiento (crudos y cocidos).
 - Inapropiado uso de temperaturas de conservación o de cocción.
 - Interrupción de la cadena de frío.
 - Inadecuado manejo de los residuos.
 - Falta de control de plagas.
 - Uso de fuentes no seguras de agua.

1.3 Microorganismos presentes en alimentos

Los alimentos crudos proceden de animales y vegetales, cuyas superficies externas están siempre contaminadas por una microflora muy heterogénea procedente de los lugares de cría o cultivo. Los tejidos internos son habitualmente estériles. Una vez que los animales han sido sacrificados o los vegetales recolectados, los productos derivados de ellos se someten a una serie de procesos con el fin de destruir o eliminar la microflora inicial. No obstante, estos procesos a veces originan una contaminación adicional o una multiplicación de los ya existentes debido a factores extrínsecos e intrínsecos que afectan la tasa de proliferación de microorganismos. Los extrínsecos son los factores medioambientales que afectan el índice de crecimiento de los microorganismos tales como la temperatura, disponibilidad de oxígeno, humedad relativa. En cambio, los factores intrínsecos son los que condicionan la tasa de proliferación, hacen referencia a las características de los sustratos que favorecen o afectan al crecimiento de los microorganismos, como actividad de agua (A_w), pH, potencial de oxidación-reducción, necesidades de nutrientes, sustancias inhibidoras (Marriot, 2003; Rey y Silvestre, 2005).

Por todo ello, es muy importante reconocer que cada etapa del proceso o manipulación puede influir tanto cualitativa como cuantitativamente, tanto en la composición de la microflora que sobrevive como en el desarrollo post-proceso, pudiendo ocasionar peligros para la salud. Se debe tener en cuenta que la presencia de microorganismos en los alimentos no significa necesariamente peligro para el consumidor, ya que la mayor parte de los alimentos se convierten en potencialmente peligrosos (como vehículo de transmisión de enfermedades), sólo después de que han sido violados algunos principios de higiene, conservación, limpieza y desinfección, lo que permite la llegada y, eventualmente, la multiplicación de agentes infecciosos o toxigénicos (Rey y Silvestre, 2005).

1.4 Enfermedades transmitidas por los alimentos

Se conoce como ETAs a las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos, que corresponden a un grupo de afecciones que tienen al alimento como responsable de vehiculizar a los agentes desencadenantes de las mismas, con síntomas visibles, predominando los gastroentéricos (vómitos, diarreas y cólico abdominal), y aquellos que son propios de la enfermedad (Martí y col., 2012).

Según la OMS, las ETAs comprenden “el conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o alimentos que contengan agentes biológicos (por ej., bacterias o parásitos) o no biológicos (por ej., plaguicidas o metales pesados) en cantidades tales

que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de grupo de personas” (FAO, 2009).

Un brote de ETA se define como dos o más personas que sufren una enfermedad similar después de haber ingerido un alimento en común (incluida el agua), y donde la evidencia epidemiológica o los resultados del laboratorio implican a los alimentos o al agua como vehículo de la misma. Aproximadamente el 66% de todos los brotes están causados por bacterias patógenas (Marriot, 2003; Guerrero y col., 2016).

Los factores que intervienen en toda enfermedad, incluidas la ETAs, son el agente, el huésped y el ambiente. Los tres constituyen la denominada “Tríada Ecológica”. De cómo sea el equilibrio y la interacción entre ellos puede depender un estado de salud o de enfermedad, en este caso, transmitida por los alimentos (Rey y Silvestre, 2005).

El agente es el responsable de que se produzca la enfermedad; así, por ejemplo, en una gastroenteritis bacteriana o vírica, el agente sería la bacteria o el virus que hubiera causado la enfermedad. Pero en toda enfermedad es imprescindible que también exista un huésped, que es el individuo donde se aloja el agente y que, por sus características biológicas, facilita que se desarrolle la enfermedad. El huésped sería, por ejemplo, el anciano o el niño que padece una ETA. Finalmente, la tríada se completa con el ambiente, que es el conjunto de factores del entorno que predisponen o influyen para que una determinada enfermedad se manifieste. En las ETAs, podrían ser factores ambientales la falta de agua segura o la existencia de plagas en la cocina (Rey y Silvestre, 2005).

Las ETAs pueden manifestarse a través de:

- **Infecciones:** son aquellas producidas por la ingestión de alimentos y/o agua contaminados con agentes infecciosos. Ejemplos: *Hepatitis, Salmonelosis, Listeriosis, Yersiniosis y Campilobacteriosis* (Martí y col., 2012).
- **Intoxicaciones:** son las producidas por la ingestión de sustancias tóxicas (toxinas) formadas en tejidos de plantas o animales, productos metabólicos de los microorganismos (toxinas) o sustancias químicas incorporadas en cualquiera de los eslabones de la cadena alimentaria. Ejemplos: intoxicación por la toxina de *estafilococo, Botulismo, por plaguicidas, por ciguatera y mariscos*, entre otros (Martí y col., 2012).
- **Toxiinfecciones:** son las que ocurren cuando los agentes infecciosos ingeridos con alimentos contaminados, producen toxinas dentro del huésped. Ejemplos: toxoinfección por *Bacillus cereus, Cólera, Botulismo Infantil* y toxoinfección por *Clostridium perfringens*, entre otros (Martí y col., 2012).

Según la OMS, en un informe donde se estimó la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria en el año 2010, 31 agentes alimentarios (11 agentes etiológicos de enfermedades diarreicas, 7 de enfermedades infecciosas invasivas, 10 helmintos y 3 productos químicos) causaron 600 millones de casos de ETA y 420.000 muertes a nivel global. Las causas más frecuentes de ETA fueron los agentes etiológicos de enfermedades diarreicas (OMS, 2015).

Los niños menores de 5 años soportan un 40% de la carga atribuible a las enfermedades de transmisión alimentaria, que provocan cada año 125.000 defunciones en este grupo de edad. Las infecciones diarreicas, que son las más comúnmente asociadas al consumo de alimentos contaminados, hacen enfermar cada año a unos 550 millones de personas y provocan 230.000 muertes (OMS, 2017a).

Merece destacarse que las estadísticas oficiales relacionadas con los casos de ETAs, no reflejan la real situación sino que muestran un verdadero efecto “iceberg”, en el cual lo que se sabe y conoce es una proporción mucho menor de una realidad que está “oculta” (Martí y col., 2012).

El riesgo de padecer ETAs es mayor en los países de ingresos bajos y medianos, y está vinculado a la preparación de alimentos con agua contaminada, la falta de higiene y condiciones inadecuadas en la producción y el almacenamiento de alimentos, el bajo nivel de alfabetismo y educación, y la insuficiencia de leyes en materia de inocuidad de los alimentos o su falta de aplicación (OMS, 2015).

La problemática sanitaria de los alimentos tiene un doble impacto. Por un lado, sobre la salud pública que se refleja en casos de ETAs, lo que se puede traducir en enfermos (morbilidad), de los cuales algunos pacientes se pueden recuperar totalmente, otros pueden quedar con secuelas transitorias y otros con secuelas permanentes o bien se traducen en muertes (mortalidad) y, por otro lado, sobre la economía que se relaciona con los gastos por atención médica, por los medicamentos y análisis de laboratorio, por los estudios epidemiológicos realizados, además de las consecuencias del desprestigio de las empresas, la pérdida de confianza de los consumidores en los alimentos involucrados, el decomiso de alimentos y el pago de indemnizaciones, entre otros (Martí y col., 2012).

1.4.1 Microorganismos que producen enfermedades de transmisión alimentaria

Las bacterias que aparecen con mayor frecuencia como productoras de ETA son: *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, entre otras (Martí y col., 2012).

- *E. coli*. Basándose en los síndromes y en las características de las enfermedades y también en su efecto en determinados cultivos celulares y en los grupos serológicos, se han identificado seis grupos virulentos de *E. coli*: enteroagregativa (EAaggEC), enterohemorrágico (EHEC), enteroinvasivo (EIEC), entopatógeno (EPEC), enterotoxigénico (ETEC) y difusamente adherente (DAEC) (Jay y col., 2005).

En Argentina, el agente etiológico más comúnmente asociado al síndrome urémico hemolítico (SUH) es un patógeno zoonótico transmitido por los alimentos y el agua: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC), cuyo serotipo más frecuente es O157:H7, aunque hay más de 100 serotipos que poseen un potencial patogénico similar (MINSAL, 2018).

El SUH es una enfermedad de comienzo agudo con anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y daño renal que se presenta generalmente a continuación de un episodio de diarrea con o sin sangre, principalmente en niños menores de 5 años. Estos síntomas pueden acompañarse con fiebre, vómitos, dolor abdominal y anuria u oliguria. Además, puede afectar otros órganos como sistema nervioso central, pulmones, páncreas, corazón y llevar a la muerte debido a complicaciones neurológicas, intestinales, cardíacas o a infecciones intercurrentes. El período de incubación es de dos a diez días, con una media de tres o cuatro días y el de transmisibilidad hasta tres semanas o más en los niños y de una semana o menos en los adultos, después del comienzo de la diarrea. Aunque en la mayoría de los casos la diarrea por STEC es autolimitada, aproximadamente 5 al 10% de los niños infectados evolucionan a SUH (MINSAL, 2018).

Los rumiantes en general, y el ganado vacuno en particular, han sido señalados como los principales reservorios de STEC. La contaminación de la canal durante el sacrificio es la ruta primaria que conduce a la contaminación de la carne vacuna picada. Las principales vías de transmisión son los alimentos contaminados como carne picada, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, embutidos fermentados, leche y jugos no pasteurizados, vegetales que se consumen crudos, etc. Otras formas de transmisión incluyen la contaminación cruzada durante la preparación de alimentos, el contacto directo del hombre con los animales, bañarse en aguas recreacionales contaminadas y de persona a persona por la ruta fecal-oral (RENALOA, 2011).

- *Salmonella* spp. Bacilo Gram negativo, viable en diferentes condiciones ambientales, sobrevive a la refrigeración y congelación y muere por calentamiento (por encima de 70 °C). Es el agente causal de la salmonelosis, siendo la vía de transmisión fecal-oral a través de alimentos y agua contaminada con heces humanas o animales,

materiales y utensilios de cocina contaminados o por contacto directo de persona a persona. La salmonelosis se puede presentar como una enfermedad no sistémica o gastroenteritis que se caracteriza por un período de incubación de 12 a 72 horas. Puede manifestarse en forma aguda con fiebre ligera (resuelve en 2 - 3 días), náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea durante unos días o una semana. La gravedad de los síntomas puede variar desde ligero malestar a deshidratación grave y en algunos casos pueden quedar secuelas crónicas. Los principales reservorios de *Salmonella* son aves de corral, ganado bovino, ganado porcino y el hombre. Otras fuentes de infección pueden ser los vegetales frescos consumidos crudos en ensaladas, huevos, leche y derivados lácteos, pescados, salsas y aderezos para ensaladas, mezclas para pasteles, postres a base de crema, gelatina en polvo, cacao y chocolate (Jay y col., 2005; RENALOA, 2011).

- *Bacillus cereus*. Bacilo Gram positivo, aerobio, que forma esporas, presente normalmente en el suelo, polvo y agua. En general, los alimentos que se procesan por secado o que se someten a calentamiento pueden contener a este microorganismo. Causa dos síndromes, según la toxina involucrada:

- Diarreico: toxoinfección alimentaria, relativamente leve, desarrollándose los síntomas en 8 - 16 horas y que duran 6 - 12 horas. Los síntomas consisten en náuseas, dolor abdominal agudo, tenesmo y heces acuosas. Los alimentos implicados consisten en platos de cereales que contienen maíz, puré de papas, hortalizas, carne picada, budines, sopa y otros (Jay y col., 2005).

- Emético: es la forma de intoxicación alimentaria más grave y aguda. El período de incubación va de 1 - 6 horas y predominan los síntomas como náuseas y vómitos. Con frecuencia se asocia al arroz hervido o frito. Además de éstos también se han visto involucrados crema pasteurizada, espagueti, puré de papas y hortalizas (Jay y col., 2005).

- *Staphylococcus aureus*. Coco Gram positivo, muy resistente en el medio ambiente y sobrevive durante períodos prolongados aún en ambientes secos. Es productor de una enterotoxina termoestable, la cual es responsable de la ETA. El hombre es el principal reservorio de este microorganismo, encontrándose en la piel y en las vías respiratorias superiores. Los animales también son una fuente importante de infección; se destaca la mastitis en los bovinos y ovinos que puede determinar la contaminación de la leche. Los alimentos asociados a brotes son: jamón, salame, carnes, sándwiches, postres, aderezos de ensaladas, etc. (Jay y col., 2005; OPS, 2017).

- *Listeria monocytogenes*. Bacteria Gram positiva capaz de crecer a temperaturas de refrigeración. Es difícil de controlar en los alimentos debido a su ubicuidad en el ambiente, la tolerancia a condiciones ambientales desfavorables, como pH bajo,

deseccación, altos niveles de cloruro de sodio y la capacidad de sobrevivir en las superficies (es decir, la formación de biofilms) contaminando, de esta manera, los productos finales. Varios alimentos tales como productos lácteos, carne, verduras, etc., estuvieron implicados en brotes asociados con este patógeno. *L. monocytogenes* causa listeriosis y es un riesgo significativo particularmente para las personas mayores, inmunocomprometidas, lactantes y mujeres embarazadas (Jay y col., 2005; Mataragas y col., 2010).

- *Clostridium perfringens*. Bacilo Gram positivo, anaerobio y esporulado, ampliamente distribuido en la naturaleza. Se encuentra en suelos, agua, polvo y en el tracto intestinal humano y de otros animales. En el ser humano produce una toxoinfección, cuyos síntomas aparecen entre las 6 y 24 horas tras la ingestión de alimentos contaminados con un elevado número de microorganismos ($>10^6$ UFC/g) los cuales al llegar al intestino delgado, esporulan y liberan las enterotoxinas. Los síntomas se caracterizan por dolor abdominal agudo y diarrea, los cuales desaparecen al cabo de un día o menos. Los alimentos implicados con mayor frecuencia son platos de carne que se consumen al día siguiente de su preparación, salsas cocinadas, guisos, sopas, comidas condimentadas con especias, tartas y alimentos que no han sido refrigerados. Es de suponer que el calentamiento durante la preparación no es el adecuado para destruir las esporas termorresistentes, las cuales germinan y crecen cuando el alimento se enfría y se vuelve a calentar (Jay y col., 2005; RENALOA, 2013).

- *Clostridium botulinum*. Bacilo Gram positivo, común en la naturaleza. Se encuentra en el suelo y es productor de la toxina neuroparalizante más potente que se conoce. Su desarrollo se ve favorecido con bajas condiciones de oxígeno (RENAPRA y ANMAT, 2017). La ETA que produce se denomina botulismo, del cual existen cuatro tipos:

- 1) Botulismo de transmisión alimentaria: se produce cuando *C. botulinum* está presente en alimentos con bajo contenido de oxígeno (considerando también algunas combinaciones de temperatura de almacenamiento y parámetros de conservación) que permiten su crecimiento y la producción de la toxina. Esto ocurre mayormente en conservas de alimentos elaboradas sin las debidas precauciones y en alimentos inapropiadamente procesados, enlatados o embotellados en hogar (conservas caseras) (OMS, 2017b).

C. botulinum no desarrolla en condiciones de acidez (pH inferior a 4,6), y por lo tanto la toxina no se generará en alimentos ácidos (aunque un pH bajo degradará ninguna toxina ya existente). La toxina botulínica se ha encontrado en conservas vegetales, tales como judías verdes, espinacas, setas y remolachas; pescados, incluido

el atún en lata y los pescados fermentados, salados y ahumados; y productos cárnicos, por ejemplo, jamón y salchichas. A pesar de que las esporas de *C. botulinum* son termorresistentes, la toxina se destruye mediante el hervor (por ejemplo, a una temperatura interna superior a los 85 °C durante al menos cinco minutos). Por consiguiente, los casos de botulismo de transmisión alimentaria frecuentemente guardan relación con alimentos listos para el consumo empaquetados con poco oxígeno (OMS, 2017b).

2) Botulismo en lactantes: suele afectar a niños menores de seis meses. Se produce cuando los lactantes ingieren esporas de *C. botulinum* que germinan como bacterias, colonizan el intestino y liberan toxinas. En la mayoría de los adultos y los niños mayores de seis meses esto no ocurre porque las defensas naturales del intestino que el organismo desarrolla con el tiempo impiden la germinación y el crecimiento de la bacteria. Aunque son varias las fuentes posibles de infección de lactantes con botulismo, la miel contaminada con esporas se ha asociado a algunos casos (OMS, 2017b).

3) Botulismo por heridas: es infrecuente y se produce cuando las esporas entran en una herida y pueden reproducirse en un medio anaeróbico (OMS, 2017b).

4) Botulismo críptico: fue propuesto para casos esporádicos que afectan a mayores de un año de edad sin antecedentes de herida o ingesta de alimento sospechoso. Es el equivalente del botulismo del lactante en el adulto y parece estar asociado a una función gastrointestinal anormal (Fernández y Ciccarelli, 1996).

1.5 Microorganismos marcadores

El examen microbiológico rutinario de los alimentos para detectar una diversidad de microorganismos patógenos y de sus toxinas, es impracticable en la mayoría de los laboratorios. Sin embargo, es imperativo realizar los análisis microbiológicos de rutina correspondientes siempre que la información epidemiológica sugiera la presencia de un agente patógeno específico en un determinado alimento. El microbiólogo de alimentos prefiere la utilización de grupos o especies de microorganismos, cuya enumeración o recuento se realiza con gran facilidad y cuya presencia en los alimentos (en determinado número) indica que estos productos estuvieron expuestos a condiciones que pudieran haber introducido organismos peligrosos y/o permitido la multiplicación de especies infecciosas o toxigénicas. Los grupos o especies utilizadas con estos fines se denominan marcadores y sirven para evaluar la seguridad que ofrecen los alimentos en cuanto a microorganismos y sus toxinas, su calidad microbiológica y predecir la vida útil del producto (Universidad de Murcia, 2017).

Cuando se utilizan de esta forma, los microorganismos marcadores según Jay y col. (2005) deben ajustarse a los siguientes criterios:

1. Deben estar presentes y a niveles detectables en todos los alimentos cuya calidad (o falta de la misma) va a estimarse.
2. Su crecimiento y número deben tener una correlación negativa directa con la calidad del producto.
3. Deben detectarse y enumerarse fácilmente y deben distinguirse claramente de otros microorganismos.
4. Deben poder contarse en un período corto, idealmente en un día de trabajo.
5. Su crecimiento no debe verse afectado adversamente por otros componentes de la microbiota.

Los microorganismos marcadores se agrupan en:

- Índices: su presencia en un alimento indica la posible presencia simultánea de microorganismos patógenos ecológicamente relacionados.
- Indicadores: ponen de manifiesto deficiencias en la calidad microbiológica de un determinado alimento en términos más generales.

A su vez, un mismo microorganismo puede ser índice e indicador (Universidad de Murcia, 2017).

Los principales microorganismos marcadores en alimentos son:

- Microorganismos aerobios mesófilos totales: reflejan la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración, alteración incipiente del alimento y las condiciones del ambiente de elaboración. La presencia de un número elevado de estos microorganismos que crecen bien a temperatura corporal o próxima a ella, significa que pueden haberse dado condiciones favorables para la multiplicación de los microorganismos patógenos de origen humano o animal, considerando que es una medida mucho menos precisa y fiable del peligro de una enfermedad alimentaria en comparación con otros indicadores (Universidad de Murcia, 2017; Pascual Anderson y col., 2000).

- Hongos y levaduras: la determinación de la contaminación fúngica del aire ha adquirido gran importancia, ya que es uno de los medios de dispersión por el cual los hongos llegan a los alimentos (Solís Cajas, 2011). En los alimentos ácidos y en los de baja actividad de agua crecen con mayor rapidez que las bacterias, determinando importantes pérdidas por alteración de frutas frescas y jugos, vegetales, quesos, alimentos salazonados, cereales y encurtidos, así como en los alimentos congelados y en los deshidratados, cuyo almacenamiento se realiza en condiciones inadecuadas. Muchos

hongos son capaces de producir intoxicación (micotoxinas), infecciones o reacciones alérgicas (Universidad de Murcia, 2017; Pascual Anderson y col., 2000).

- Enterobacterias: son utilizadas frecuentemente como indicadores de higiene por los procesadores de alimentos para demostrar la adherencia a las Buenas Prácticas de Higiene y de Manufactura durante la elaboración. Su presencia en altos niveles en los alimentos preparados, manipuladores o superficies, es debida principalmente a una contaminación adicional tanto durante el manejo (condiciones inadecuadas), como el almacenamiento prolongado a temperatura elevada y deficiente manipulación posterior o una combinación de ambos factores. También se puede deber a un proceso de cocción inadecuado (Motarjemi y Adams, 2006).

- Coliformes totales: son bacilos no formadores de esporas, Gram negativos que fermentan la lactosa en 48 horas a una temperatura de 35 °C. Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, pero también en otros ambientes como suelo, plantas, etc. En general, niveles altos de coliformes indican una deficiente manipulación y elaboración de los alimentos. A su vez, su detección se utiliza para medir la eficacia de los programas de saneamiento y su presencia indica un riesgo sustancialmente mayor de presencia de patógenos. Estos organismos se eliminan fácilmente por tratamiento térmico, por lo cual su presencia en alimentos sometidos al calor sugiere una contaminación posterior al tratamiento térmico o que éste ha sido deficiente (Jay y col., 2005; Lues y Van Tonder, 2007; Pascual Anderson y col., 2000; ANMAT, 2017).

- Coliformes fecales: se caracterizan por la producción de ácido y gas en caldo EC entre 44 °C y 46 °C, habitualmente 44,5 °C o 45,5 °C (Jay y col., 2005). El hallazgo de gran número de coliformes fecales en los alimentos indica contaminación fecal directa o indirecta y permite sospechar la presencia de agentes etiológicos productores de enfermedad (Arias-Echandi y Antillón, 2000; Jay y col., 2005).

- *Escherichia coli*: es un microorganismo cuyo hábitat natural es el tracto entérico del hombre y los animales. Por ello, la presencia de este microorganismo en un alimento indica generalmente una contaminación directa o indirecta de origen fecal. Cifras sustanciales de esta bacteria en un alimento sugieren una falta general de limpieza en el manejo del mismo y un almacenamiento inadecuado. La presencia de *E. coli* en un alimento no constituye una connotación directa de la presencia de un patógeno, sino que implica únicamente un cierto riesgo de que pudiera estar presente (Universidad de Murcia, 2017).

- Anaerobios sulfito reductores: pueden proceder del intestino del hombre o de los animales. Son anaerobios, capaces de formar esporas, pudiendo permanecer en este estado por largos períodos en la tierra, el agua, en alimentos vegetales y, en general, en

todo el ambiente por lo que es muy fácil que se incorporen a los alimentos, ya sea formando parte de la materia prima o en el proceso de fabricación, conservación, empaquetado, transporte o almacenamiento (Universidad de Murcia, 2017). Son indicadores de la calidad higiénica del agua y de productos de origen animal (Pascual Anderson y col., 2000).

- *Staphylococcus aureus*: se encuentran en las fosas nasales, la piel y las lesiones de humanos y otros mamíferos. La contaminación de los alimentos puede ocurrir desde los operadores y por contaminación cruzada por el uso de utensilios contaminados o materias primas contaminadas (RENALOA, 2013). Se los utiliza como componentes de criterios microbiológicos para alimentos cocidos, para productos que son sometidos a manipulación excesiva durante su preparación y para aquellos que son sometidos a manipulación después del proceso térmico. Generalmente, los estafilococos se eliminan durante la cocción. Un número elevado de estafilococos puede indicar la presencia de toxinas termoestables; no obstante, un recuento bajo no significa ausencia de las mismas, ya que una población numerosa pudo haberse reducido a un número más pequeño debido a una etapa del proceso, por ej., calentamiento o fermentación (Jay y col., 2005; ANMAT, 2017).

1.6 Seguridad alimentaria

La seguridad alimentaria existe cuando todas las personas tienen, en todo momento, acceso físico, social y económico a alimentos suficientes, inocuos y nutritivos que satisfacen sus necesidades energéticas diarias y preferencias alimentarias para llevar una vida activa y saludable (FAO, 2011).

La definición plantea cuatro dimensiones primordiales de la seguridad alimentaria y nutricional:

- Disponibilidad de Alimentos: *corresponde a la provisión, suministro o existencia de alimentos, es decir, aborda lo relacionado con la existencia de cantidades suficientes de alimentos de calidad adecuada, suministrados a través de la producción del país o de importaciones, comprendida la ayuda alimentaria.*
- Acceso a los Alimentos: *corresponde a la presencia de los recursos económicos y las facilidades físicas para que las personas puedan adquirir los alimentos disponibles para cumplir sus necesidades.*
- Utilización de los Alimentos: *corresponde a la influencia de la calidad alimentaria y las condiciones de vida, en la situación nutricional y la salud de los individuos.*
- Estabilidad de las dimensiones de la Seguridad alimentaria y nutricional: *corresponde a la garantía de la disponibilidad, acceso y utilización adecuada de los*

alimentos por parte de las personas y los hogares, en todo momento (FAO y OPS, 2017).

La Comunidad de Estados Latinoamericanos y Caribeños (CELAC) solicitó apoyo a la FAO y la ALADI (Asociación Latinoamericana de Integración) para crear la Plataforma para la Seguridad Alimentaria y Nutricional, un sistema de información sobre políticas públicas e indicadores que permite caracterizar los elementos que han contribuido a los avances de América Latina y el Caribe en la erradicación del hambre. La Plataforma entrega la última información disponible para todos los países de América Latina y el Caribe respecto al estado de la seguridad alimentaria y nutricional, mediante los principales indicadores socioeconómicos, nutricionales y productivos que caracterizan a los países que integran la región. Además, presenta los marcos normativos e institucionales y las políticas, estrategias y programas públicos que estos países están implementando en el marco de la seguridad alimentaria y nutricional (FAO, ALADI y CEPAL, 2017).

Por lo tanto, en Argentina existe actualmente un Plan Nacional de Seguridad Alimentaria (PNSA) que fue creado en 2003 en el marco de la Ley 25.724, con el objetivo de posibilitar el acceso de la población en situación de vulnerabilidad social a una alimentación complementaria, suficiente y acorde a las particularidades y costumbres de cada región del país. En este sentido, la ejecución del PNSA involucra en sus líneas de acción los distintos aspectos necesarios para promover la seguridad alimentaria y realiza actividades de educación nutricional que aseguren el derecho a tener acceso a información científica, culturalmente aceptada y adecuada a las distintas comunidades del país (FAO, ALADI y CEPAL, 2017).

En España existe la Ley 17/2011 de seguridad alimentaria y nutrición, la cual constituye el soporte legal sobre el que se fundamentan todas las actuaciones relacionadas con la seguridad alimentaria (BOE, 2011).

En Estado Unidos fue aprobada la Ley de Modernización de la Seguridad Alimentaria de la FDA (FSMA), la reforma más radical de sus leyes de seguridad alimentaria en más de 70 años. Su objetivo es garantizar que el suministro de alimentos de EE. UU. sea seguro al cambiar el enfoque de responder a la contaminación a prevenirla (FDA, 2017).

En el Reino Unido existe la Ley de Seguridad de los Alimentos (1990) que tiene por objeto controlar todos los aspectos de la seguridad alimentaria mediante la llamada cadena alimenticia desde las granjas e incluso desde los piensos animales, hasta los

lugares de venta. Busca proteger la salud humana asegurando la calidad global del alimento que debe producirse y manipularse en un ambiente convenientemente higiénico. Por lo tanto, la ley abarca la construcción, disposición, mantenimiento y limpieza de los locales y del equipo que contiene, en donde se prepara y manipula el alimento. También se preocupa de las exigencias higiénicas del personal, tanto los propietarios como los empleados implicados en actividades alimentarias deben recibir información en higiene alimentaria, mediante cursos organizados por la industria alimentaria y/o las autoridades sanitarias (Forsythe y Hayes, 2007).

Para realizar la prevención en todos los eslabones de la cadena de producción de alimentos es necesario implementar sistemas de aseguramiento de la inocuidad y la calidad de los mismos basados en los principios definidos en las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES) y los Sistemas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) (Mercado, 2007).

1.6.1 Buenas Prácticas de Manufactura

Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) son herramientas básicas para la obtención de productos alimenticios inocuos. Los ejes principales de estas herramientas son la higiene y la manipulación. Los objetivos de estas prácticas son, principalmente, establecer las normas generales y específicas para la operatividad de las actividades y asegurar que el personal conozca el concepto de inocuidad, la importancia de su resguardo y la responsabilidad que conlleva la tarea. Además, sus objetivos también alcanzan al aseguramiento de la inocuidad de los alimentos envasados (INTI, 2016).

El Código Alimentario Argentino (CAA) incluye en su Capítulo II la obligación de aplicar las BPM en alimentos; así mismo, la Resolución 80/96 del Reglamento del Mercosur indica la aplicación de las BPM para establecimientos elaboradores de alimentos que comercializan sus productos en dicho mercado (CAA, 2010).

Estas prácticas incluyen:

- **Materias primas:** deben ser almacenadas en condiciones apropiadas que aseguren su protección contra contaminantes y, además, en condiciones óptimas de temperatura, humedad, ventilación e iluminación (Feldman y col., 2016).
- **Manipulador de alimentos:** es toda persona que manipula directamente alimentos envasados o no envasados, equipos y utensilios utilizados para los alimentos o superficies que entren en contacto con los alimentos. Es obligatoria la provisión de la

Libreta Sanitaria Nacional Única, expedida por la Autoridad Sanitaria Competente y con validez nacional (CAAb, 2010; FAO, OPS y OMS, 2016).

Debe controlarse el estado de salud y la aparición de posibles enfermedades contagiosas entre los manipuladores. Por otra parte, ninguna persona que sufra una herida puede manipular alimentos o superficies en contacto con alimentos hasta su alta médica (Feldman y col., 2016; INTI, 2016).

Es indispensable el lavado de manos de manera frecuente y minuciosa con un agente de limpieza autorizado y con agua potable. Debe realizarse antes de iniciar el trabajo, inmediatamente después de haber hecho uso del baño, después de haber manipulado material contaminado y todas las veces que las manos se vuelvan un factor contaminante. En cuanto los guantes, es importante destacar y remarcar que su uso no excluye el lavado de manos ni la higiene y prolijidad de las uñas, ni el cuidado de las heridas que pudieran presentar las manos. Además, es necesario su recambio en tiempo y forma para evitar que se conviertan en un punto de contaminación (Feldman y col., 2016; INTI, 2016).

Todo el personal que esté de servicio en la zona de manipulación debe llevar ropa protectora, calzado adecuado y cofia, lavables o descartables. Respecto del uso de barbijos, se recomienda utilizarlo adecuadamente sin excepción en el punto crítico del proceso, que es el servicio y expendio del alimento listo para consumir. No debe trabajarse con efectos personales. La higiene también involucra conductas que puedan dar lugar a la contaminación, tales como comer, fumar, salivar u otras prácticas antihigiénicas. Los manipuladores de alimentos deben recibir la capacitación primaria y continua (Feldman y col., 2016; INTI, 2016).

- Establecimientos: existen dos ejes: Estructura e Higiene

a. Estructura: el establecimiento debe estar ubicado en zonas que no se inundan, que no contengan olores, humo, polvo, gases y/u otros elementos que puedan afectar la calidad del producto que se elabora. Las vías de tránsito externo deben tener una superficie pavimentada para permitir la correcta circulación de camiones, transportes internos y contenedores (Feldman y col., 2016; INTI, 2016).

En los edificios e instalaciones, las estructuras deben ser resistentes al tránsito interno de vehículos y sanitariamente adecuadas a fin de facilitar la limpieza y desinfección. Las aberturas deben contar con un método adecuado de protección para impedir la entrada de animales domésticos, insectos, roedores, moscas y contaminantes del ambiente como humo, polvo, vapor, entre otros. La iluminación debe ser óptima. A su vez, es obligatorio el uso de protección en las lámparas. Las bocas de ventilación deben evitar la circulación de aire de zonas contaminadas a zonas donde se manipulan alimentos (Feldman y col., 2016; INTI, 2016).

El espacio debe ser amplio y los empleados deben tener presente qué operación se realiza en cada sección, siendo fundamental señalar correctamente cada área. Además, debe tener un diseño que permita realizar eficazmente las operaciones de limpieza y desinfección. El agua utilizada debe ser potable, a la presión adecuada y a la temperatura necesaria (Feldman y col., 2016; INTI, 2016).

Los equipos y los utensilios para la manipulación de alimentos deben ser de un material que no transmita sustancias tóxicas, olores ni sabores, por ejemplo acero inoxidable. Las superficies de trabajo no deben tener hoyos, ni grietas. Se recomienda evitar el uso de maderas y de productos que puedan corroerse (Feldman y col., 2016; INTI, 2016).

b. Higiene: para organizar las tareas de limpieza y desinfección es recomendable aplicar los POES (Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento) (Feldman y col., 2016; INTI, 2016).

Las sustancias tóxicas como plaguicidas, solventes u otras que puedan representar un riesgo para la salud y una posible fuente de contaminación, deben estar rotuladas con un etiquetado bien visible y ser almacenadas en áreas exclusivas. Estas sustancias deben ser manipuladas sólo por personas autorizadas (Feldman y col., 2016; INTI, 2016).

- Higiene en la elaboración: si se sospecha que podría existir contaminación, debería aislarse el producto en cuestión e higienizar adecuadamente todos los equipos y utensilios que hayan estado en contacto (Feldman y col., 2016).

- Los recipientes deben tratarse adecuadamente para evitar su contaminación y deben respetarse los métodos de conservación. El material destinado al envasado y empaque debe estar libre de contaminantes y no debe permitir la migración de sustancias. Debe inspeccionarse siempre a fin de asegurar que se encuentra en buen estado (Feldman y col., 2016).

- Almacenamiento y transporte de materias primas y producto final: las materias primas y el producto final deben almacenarse y transportarse en condiciones óptimas para impedir la contaminación y/o la proliferación de microorganismos (Feldman y col., 2016).

- Control de procesos en la producción: para tener un resultado óptimo en las BPM son necesarios ciertos controles que aseguren el cumplimiento de los procedimientos y los criterios para garantizar inocuidad y lograr la calidad esperada en un alimento (Feldman y col., 2016).

- Documentación: tiene el propósito de definir los procedimientos y los controles. Además, permite un fácil y rápido rastreo de productos ante la investigación de productos defectuosos, debiendo diferenciar números de lotes, siguiendo la historia de los alimentos desde la utilización de insumos hasta el producto terminado, incluyendo el transporte y la distribución (Feldman y col., 2016).

1.6.2 Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento

Los procedimientos operativos estandarizados describen las tareas de limpieza y desinfección (POES). Se aplican antes, durante y después de las operaciones de elaboración (Feldman y col., 2016).

Los 5 tópicos que consideran los POES según Acosta (2008) y Feldman y col. (2016) son:

- Tópico 1: cada establecimiento debe tener un plan escrito que describa los procedimientos diarios que se realizarán durante y entre las operaciones, la frecuencia y las acciones correctivas tomadas para prevenir la contaminación de los productos. Los encargados de la inspección del plan deben exigir que el personal lleve a cabo los procedimientos establecidos y que actúe si se producen contaminaciones directas de los productos.

- Tópico 2: cada POES debe estar firmado por una persona de la empresa con total autoridad en el lugar o por una persona de alta jerarquía en la planta. La importancia de este punto radica en que la higiene constituye un reflejo de los conocimientos, actitudes y políticas de la dirección.

- Tópico 3: los procedimientos pre-operacionales se llevan a cabo en los intervalos de producción y deben incluir la limpieza y desinfección de superficies, instalaciones y equipos y utensilios que están en contacto con alimentos. El resultado será una adecuada higiene antes de empezar la producción.

Los procedimientos de saneamiento operacional se realizan durante las operaciones y, además, deben hacer referencia a la higiene del personal.

- Tópico 4: los establecimientos deben tener registros diarios que demuestren que se están llevando a cabo los procedimientos que fueron delineados en el plan de POES, incluyendo las acciones correctivas que fueron tomadas.

- Tópico 5: una planta elaboradora deberá disponer, como mínimo, de los siguientes POES: higiene de manos; de líneas de producción; de áreas de recepción, depósitos de materias primas, intermedios y productos terminados; de silos, tanques, cisternas, tambores, carros, bandejas, campanas, ductos de entrada y extracción de aire; de líneas de transferencia internas y externas a la planta; de cámaras frigoríficas y heladeras; de

lavaderos; de paredes, ventanas, techos, zócalos, pisos y desagües de todas las áreas; de superficies en contacto con alimentos, incluyendo básculas, balanzas, contenedores, mesadas, cintas transportadoras, utensilios, guantes, vestimenta externa, etc.; del comedor del personal; de instalaciones sanitarias y vestuarios.

Cada establecimiento debe elegir los métodos de control más operativos y, además, un responsable para comprobar que el plan es puesto en práctica y es eficaz para la seguridad alimentaria y la frecuencia de los mismos.

Algunos controles son:

- Inspección visual: es el método más utilizado y consiste en comprobar que se han realizado las actividades previstas de forma adecuada de forma que no queden restos visibles de suciedad después de la higiene del establecimiento. Es un método rápido pero subjetivo (CM, 2011).
- Control microbiológico: consiste en evaluar la población de microorganismos (ejemplo: aerobios, enterobacterias) que quedan en las superficies o en el ambiente tras el proceso de higiene mediante diferentes métodos (hisopados de superficies vivas e inertes, recuento de colonias fúngicas en placas de sedimentación, contacto directo, etc.) (CM, 2011).
- Productos químicos: uso de tiras reactivas o kits (control por bioluminiscencia, control mediante equipos de detección rápida de residuos proteicos, etc.) (CM, 2011).

1.6.3 Manejo Integrado de Plagas

Se define como plaga a aquellos animales que compiten con el hombre en la búsqueda de agua y alimentos, invadiendo los espacios en los que se desarrollan las actividades humanas. Su presencia resulta molesta y desagradable, pudiendo dañar estructuras o bienes, y constituyen uno de los más importantes vectores para la propagación de enfermedades, entre las que se destacan las ETAs (Feldman y col., 2016).

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) es la utilización de todos los recursos necesarios, por medio de procedimientos operativos estandarizados, para minimizar los peligros ocasionados por la presencia de plagas. A diferencia del control de plagas tradicional (sistema reactivo), el MIP es un sistema proactivo que se adelanta a la incidencia del impacto de las plagas en los procesos productivos (Feldman y col., 2016).

Para lograr un adecuado plan de tareas y obtener un óptimo resultado, según INTI (2016) se deben seguir los siguientes pasos:

1. Diagnóstico de las instalaciones e identificación de sectores de riesgo
2. Monitoreo
3. Mantenimiento e higiene (control no químico)
4. Aplicación de productos (control químico)
5. Verificación (control de gestión)

En establecimientos de cierta complejidad, el control de plagas se terceriza contratando a empresas especializadas en el tema, pero de todos modos el manipulador siempre es un eslabón de la cadena relevante y necesario, ya que resulta ser quien controla que el sistema funcione y aplica medidas correctivas de ser necesario (INTI, 2016).

Los avances en la aplicación de los sistemas de gestión de la inocuidad como los POES, las BPM, el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP, sus siglas en inglés) y la legislación cada vez más creciente sobre criterios microbiológicos de alimentos, intensificaron la vigilancia del estado sanitario del ambiente en las áreas de proceso ya que podrían ser fuente de contaminación de los alimentos (Britania, 2017).

1.7 Biofilms

La vida microbiana abunda en superficies y en entornos naturales e industriales, uno de los cuales es la industria alimentaria. Un sustrato sólido, agua y algunos nutrientes son suficientes para permitir la construcción de una fortaleza microbiana, los llamados biofilms (Bridier y col., 2015).

El biofilm es una matriz formada por microorganismos que se adhieren a las superficies y forman películas o bioincrustaciones a las que no llegan los bactericidas. La adherencia está relacionada con polímeros extracelulares -polisacáridos y glicoproteínas- de los microorganismos y depende del pH, temperatura y otros factores (Britania, 2017). Las matrices orgánicas gelatinosas aseguran la cohesión de estas estructuras biológicas y contribuyen a su resistencia y persistencia. Además, lejos de ser simples conjuntos tridimensionales de células idénticas, los biofilms están compuestos por subpoblaciones heterogéneas con comportamientos distintivos, que contribuyen a su éxito ecológico global (Bridier y col., 2015). Varios microorganismos patógenos son capaces de formar biofilms: *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp., etc (Britania, 2017).

El establecimiento y la persistencia de patógenos transmitidos por alimentos en el ambiente de procesamiento de alimentos, está íntimamente relacionado con su respuesta a factores tanto bióticos como abióticos. La mayoría de los agentes patógenos involucrados en las ETAs son capaces de adherirse y formar biofilms en la mayoría de los materiales (acero, vidrio, fórmica, polipropileno, etc.) y en casi todas las condiciones ambientales encontradas en las plantas de producción de alimentos, por lo que puede tener un impacto significativo en la salud pública. Dada la proximidad espacial entre sus habitantes, recientemente se ha sugerido que los biofilms en la industria alimenticia son óptimos para las transferencias de plásmidos, incluyendo plásmidos antibióticos multirresistentes (Bridier y col., 2015; Britania, 2017).

Para hacer frente a esta colonización de superficies por organismos no deseados, los operadores industriales implementaron una serie de procedimientos de higiene que incluyen limpieza y desinfección. Se reconoce que la resistencia de los biofilms a estos procedimientos de higiene es multifactorial, como resultado de la acumulación de diferentes mecanismos relacionados con la arquitectura de los mismos. También se ha demostrado que tanto el uso de biocidas químicos como la contaminación del medio, sólo producen una perturbación transitoria de los ecosistemas asociados a la superficie. Por lo tanto, los fabricantes de alimentos deben abordar problemas conflictivos como la seguridad de los consumidores y la protección del ambiente, a pesar de que carecen de información objetiva para orientar sus elecciones tecnológicas (Bridier y col., 2015).

1.8 Comidas preparadas. Normativa.

Según el artículo 156 tris del Código Alimentario Argentino (CAA), se entiende por comida preparada lista para consumo, la elaboración culinaria resultado de la preparación con o sin cocción de uno o varios productos alimenticios de origen animal o vegetal, con o sin adición de otras sustancias autorizadas para el consumo. Podrá presentarse envasada o ser fraccionada a la vista o no del consumidor en el momento de ser dispensada y estar dispuesta para el consumo directamente, o bien tras su calentamiento.

De acuerdo a la forma de preparación, las comidas preparadas listas para el consumo se clasifican en:

- I. Comidas preparadas sin tratamiento térmico.
- II. Comidas preparadas con tratamiento térmico que incluyan posteriormente ingredientes no sometidos a tratamiento térmico.

III. Comidas preparadas con tratamiento térmico que reciban un proceso de manipulación post tratamiento térmico tal como cortado, mezclado, feteado, envasado, entre otros.

IV. Comidas preparadas que al final de su elaboración hayan sido sometidas en su conjunto a un proceso térmico.

En las tablas 1 y 2 se detallan las especificaciones microbiológicas para las comidas preparadas según los ítems I, II, III y IV.

Tabla 1: Especificaciones microbiológicas para comidas preparadas según ítems I, II y III.

Parámetro	Criterio de aceptación	Metodología ⁽¹⁾
Recuento de Enterobacterias ⁽²⁾ (UFC/g)	n=5, c=2 m=10 ³ , M=10 ⁴	ISO 21528-2:2004 ICMSF
Recuento de <i>E. coli</i> (NMP/g)	n=5, c=0 m<3	ISO 16649-3:2005 ICMSF (método 1) BAM-FDA:2002 (método 1)
Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (NMP/g)	n=5, c=0 m=10, M=10 ²	ISO 6888-3:1999ICMSF
<i>Salmonella</i> spp.	n=5, c=0 Ausencia en 25 g	ISO 6579:2002 Co: 2004 BAM-FDA:2011 USDA- FSIS:2011
<i>Listeria monocytogenes</i>	n=5, c=0 Ausencia en 25 g	ISO 11290-1:1996; Amd:2004 BAM-FDA:2011 USDA-FSIS:2009
Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> ⁽³⁾ (UFC/g)	n=5, c=1 m=10 ² , M=10 ³	ISO 7937:2004
Recuento de presuntos <i>Bacillus cereus</i> ⁽⁴⁾ (UFC/g)	n=5, c=1, m=10 ² , M=10 ³	ISO 7932:2004
<i>E. coli</i> O157:H7/NM ⁽⁵⁾	n=5, c=0 Ausencia en 65 g	USDA-FSIS:2010 ISO 16654:2001 BAM-FDA:2011
<i>E. coli</i> no O157 ⁽⁵⁾⁽⁶⁾	n=5, c=0 Ausencia en 65 g	ISO 13136: 2012 BAM-FDA: 2014

(1) o su versión más actualizada.

(2) En caso de llevar como ingredientes vegetales crudos no realizar esta determinación.

(3) Incluir sólo en alimentos con carnes.

(4) Incluir sólo en alimentos con cereales, papas, amiláceos.

(5) En alimentos a base de carne picada y/o vegetales crudos.

(6) *E. coli* productor de toxina Shiga de los serogrupos: O145, O121, O26, O111 y O103. Se tendrán en cuenta sólo los aislamientos positivos para los genes *stx* y *eae*, de los serogrupos mencionados

(CAA, 2017)

Tabla 2: Especificaciones microbiológicas para comidas preparadas según ítem IV

Parámetro	Criterio de aceptación	Metodología ⁽¹⁾
Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	n=5, c=2 m=10 ⁴ , M=10 ⁵	ISO 48833:2003 BAM-FDA:2001
Recuento de Enterobacterias (UFC/g)	n=5, c=2 m=10 ² , M=5x10 ²	ISO 21528-2:2004 ICMSF
Recuento de <i>E. coli</i> (NMP/g)	n=5, c=0 m<3	ISO 16649-3:2005 ICMSF (método 1) BAM-FDA:2002 (método 1)
Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (NMP/g)	n=5, c=1 m=10, M=10 ²	ISO 6888-3:1999 ICMSF
<i>Salmonella</i> spp.	n=5, c=0 Ausencia en 25 g	ISO 6579:2002, Co: 2004 BAM-FDA:2011 USDA- FSIS:2011
<i>Listeria monocytogenes</i>	n=5, c=0 Ausencia en 25 g	ISO 11290-1:1996; Amd:2004 BAM-FDA:2011 USDA-FSIS:2009
Recuento de presuntos <i>Bacillus cereus</i> ⁽²⁾ (UFC/g)	n=5, c=1 m=10 ² , M=10 ³	ISO 7932:2004
Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> ⁽³⁾ (UFC/g)	n=5, c=1 m=10 ² , M=10 ³	ISO 7937:2004
<i>E. coli</i> O157:H7/NM ⁽⁴⁾	n=5, c=0 Ausencia en 65 g	USDA-FSIS:2010 ISO 16654:2001 BAM-FDA:2011
<i>E. coli</i> no O157 ⁽⁵⁾⁽⁶⁾	n=5, c=0 Ausencia en 65 g	ISO 13136: 2012 BAM-FDA: 2014

(1) o su versión más actualizada

(2) Incluir sólo en alimentos con cereales, papas, amiláceos

(3) Incluir sólo en alimentos con carnes

(4) Incluir sólo en alimentos preparados a base de carne picada, tales como albóndigas, empanadas, pasteles, arrollados o similares.

(5) En alimentos a base de carne picada y/o vegetales crudos.

(6) *E. coli* productor de toxina Shiga de los serogrupos: O145, O121, O26, O111 y O103. Se tendrán en cuenta sólo los aislamientos positivos para los genes *stx* y *eae*, de los serogrupos mencionados.

(CAA, 2017)

En situaciones de riesgo epidemiológico que justifiquen un alerta sanitario, deberán ser realizadas otras determinaciones microbiológicas no incluidas en las normas y patrones establecidos, en función del problema (CAA, 2017).

Además, otros países han legislado acerca de las comidas preparadas listas para consumo humano, tal es el caso del reglamento de la Comunidad Europea (CAE, 2000), en Turquía existe el Código Alimentario Turco (Aycicek y col., 2004 b; TGC, 2011) mientras que en Brasil, existe el Reglamento de la ANVISA (ANVISA, 2001).

El estudio de la calidad microbiológica de los alimentos y del ambiente, fue realizado en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto (figura 1). El mismo está ubicado en el campus universitario sobre la Ruta Nacional 36, km 601. Posee una cobertura edilicia de 1.537 m² de las cuales 234 m² corresponden al sitio de elaboración de productos alimenticios y 1.303 m² a un salón de recepción que pueden ocupar 400 comensales.

Para organizar la demanda la administración del comedor, estableció que el expendio de 900 menús diarios se realice en 4 turnos (30 minutos cada uno) que comienzan a las 12 h y finalizan a las 14 h. Además, se elaboran aproximadamente 100 menús alternativos.

El menú diario consiste en sopa, plato principal que varía durante la semana, pan y fruta, mientras que el menú alternativo incluye un plato principal que es diferente al menú diario, ya que emplea materias primas de mayor costo, pan y fruta.

El personal del comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto, está bajo la supervisión de una Licenciada en Nutrición y un responsable administrativo. En el mismo desarrollan sus actividades 32 personas que realizan tareas de limpieza, elaboración de menús, administración y atención al público. Sólo 10 operadores son los encargados de elaborar el menú.

Al establecimiento concurren diariamente 2.000 personas aproximadamente que, debido a la escasez de personal, infraestructura y motivos económicos, no puede satisfacer la demanda existente. Esta problemática llevó a la necesidad de incorporar empresas elaboradoras de alimentos de la ciudad de Río Cuarto y zona para que provean al sector de minutas con diversos productos alimenticios: panificación (facturas, rasquetas, etc.), sándwiches, ensaladas, pizzetas, pastas, tartas, empanadas, ensaladas de frutas, postres y otras comidas preparadas listas para el consumo.

Debido a que el establecimiento no cuenta con habilitación ni supervisión municipal por encontrarse en jurisdicción nacional, los controles microbiológicos realizados a los productos finales elaborados por el comedor, alimentos listos para el consumo elaborados por terceros, ambiente y operarios, están a cargo, desde aproximadamente 16 años, del Departamento de Microbiología e Inmunología, área de Microbiología de Alimentos. Con los datos que surgen a partir de los análisis realizados, se elaboran informes que aportan resultados útiles, no sólo para el área demandante sino también para el grupo prestador de servicios, ya que estas empresas no sólo comercializan sus

1. Introducción

productos en el comedor universitario, sino en toda la ciudad de Río Cuarto y municipios aledaños, siendo en numerosas oportunidades los únicos controles a los que se someten.

2. Hipótesis

La implementación de Buenas Prácticas de Manufactura en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto permite obtener alimentos de calidad microbiológica aceptable.

3.1 Objetivo general:

Evaluar la calidad microbiológica de comidas preparadas en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto y de comidas elaboradas por empresas que proveen al comedor universitario.

3.2 Objetivos específicos:

- Determinar la calidad microbiológica de las materias primas utilizadas en la elaboración de las comidas preparadas.
- Determinar la calidad microbiológica de las comidas elaboradas en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Determinar la calidad microbiológica de las comidas elaboradas en empresas de la ciudad de Río Cuarto y la región, que se expenden en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Realizar el control microbiológico de muestras ambientales de los sitios donde se elaboran, comercializan y conservan los productos alimenticios.

4.1 Toma de muestras

Se tomaron y analizaron 73 muestras de productos alimenticios del Comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto durante el período comprendido entre abril del año 2016 a julio del 2017. Del total, 58 muestras correspondieron a comidas listas para el consumo y 5 pertenecieron a materias primas. Además, se tomaron 8 muestras de alimentos que en una primera instancia de análisis no cumplieron con la normativa vigente y que se estudiaron nuevamente después de aplicar en los establecimientos las medidas correctivas correspondientes. También se analizó 1 muestra de comida preparada con características organolépticas no aceptables a solicitud de la responsable a cargo y su materia prima.

Se realizaron además, dos muestreos ambientales de superficies, operarios y aire en el sector cocina del comedor universitario, antes y después de la limpieza y sanitización diarias. El primer muestreo se realizó en noviembre de 2016 y el segundo muestreo en junio de 2017.

El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera:

-Productos elaborados: los alimentos listos para el consumo fueron llevados inmediatamente al laboratorio para su análisis. Se tomaron un total de 67 muestras de productos terminados: 21 platos elaborados por el comedor universitario, de los cuales 20 muestras pertenecían al menú diario y 1 muestra al menú alternativo (tabla 3), y 37 pertenecientes a 8 empresas de la ciudad de Río Cuarto (tabla 4). Además, se tomaron 8 muestras de alimentos que en una primera instancia de análisis no cumplieron con la normativa vigente y que se estudiaron nuevamente después de aplicar en los establecimientos las medidas correctivas correspondientes. También se analizó 1 muestra de comida preparada con características organolépticas no aceptables a solicitud de la Licenciada en Nutrición, profesional que supervisa la elaboración de comidas preparadas en el comedor universitario.

La calidad microbiológica de las muestras de alimentos listos para el consumo analizados fue establecida verificando el cumplimiento de las normas microbiológicas establecidas en el artículo 156 tris del Código Alimentario Argentino (CAA) vigente en el ámbito de la República Argentina.

-Materias primas: se realizó el análisis de 6 materias primas, 1 procedente del comedor universitario y 5 de una empresa de la ciudad de Río Cuarto (tabla 5). La toma de muestra de las materias primas provenientes de la empresa externa fue realizada por el dueño bajo recomendaciones del personal de Microbiología de Alimentos.

-Ambientales: en el primer muestreo ambiental se tomaron 57 muestras del sector cocina del comedor universitario, de las cuales 27 pertenecieron a superficies inertes, 10 a superficies vivas y 20 al ambiente (tablas 6, 7, 8 y 9). En el segundo muestreo se tomaron 55 muestras en el mismo sector del comedor, de las cuales 26 pertenecieron a superficies inertes, 9 a superficies vivas y 20 al ambiente (tablas 10, 11, 12 y 13). Todas las muestras fueron llevadas de inmediato al laboratorio para su análisis.

Tabla 3: Alimentos elaborados en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto

Tipo de menú	Muestras
Diario	Milanesa de cerdo con puré mixto (*)
	Polenta y albóndigas con salsa (*)
	Milanesa de cerdo con puré de papa (*)
	Pollo al horno con ensalada de zanahoria y repollo
	Arrollado de carne relleno con verduras con ensalada de zanahoria y repollo
	Pollo y fideos con verdura salteada
	Arrollado de carne relleno con verduras salteadas (zanahoria y cebolla) (**)
	Milanesa de ternera con puré de papa
	Milanesa de ternera con arroz (*)
	Pastel de carne
	Ensalada de lechuga y zanahoria con cebolla
	Hamburguesas de carne con arroz y queso
	Hamburguesas de carne con arroz primavera
	Pastel de carne con ensalada de repollo y zanahoria
	Carré de cerdo con puré mixto
	Pollo y fideos con salsa
Milanesa de pollo con puré de papa	
Alternativo	Ravioles de ricota con salsa

(*) Menús que se analizaron 2 veces en fechas diferentes.

(**) Muestra solicitada por el responsable a cargo.

Tabla 4: Alimentos elaborados por distintas empresas de la ciudad de Río Cuarto

Empresa	Muestras
Empresa 1	Milanesa de pollo gratinada con papas fritas
	Ensalada de jamón cocido, queso Tybo, huevo duro, zanahoria cocida, arroz, papa hervida, pollo hervido)
	Costeleta de ternera con arroz y verdura
Empresa 2	Pionono de verduras (zanahoria, espinaca, cebolla)
	Peceto y zapallitos con huevo
	Bombas de carne con arroz integral (*)
	Milanesas de berenjena con mil hojas

4. Materiales y Métodos

Empresa 3	Hamburguesas de carne vacuna con papas fritas
	Milanesa de carne vacuna con guarnición (lentejas, arroz, zanahoria y tomate)
	Tarta de jamón y queso
	Hamburguesa de pollo con remolacha y tomate
	Milanesa de ternera con ensalada (tomate, huevo duro, zanahoria)
	Canelones de verdura y carne
Empresa 4	Pebete de jamón y queso
	Empanadas de pollo
	Sándwich pan de miga de jamón y queso
	Pebete pan francés de jamón y queso
	Sacramento de jamón y queso
	Empanas árabes
Empresa 5	Ensalada (huevo duro, queso, zanahoria hervida, pollo hervido)
	Guiso de lentejas
	Mayonesa de ave
	Canelones de carne y verdura
	Arroz primavera
	Bifes a la criolla
Empresa 6	Sándwich de milanesa de carne vacuna con jamón y queso
	Sándwich pan de miga (salvado) de jamón y queso
	Pizzeta
	Sándwich pan de miga de bondiola y queso
	Pebete pan francés de milán y queso
Empresa 7	Sándwich pan árabe de jamón y queso (*)
	Sándwich pan de miga de verdura y jamón cocido
	Sándwich pan árabe de jamón , queso, huevo duro y tomate (*)
	Sándwich pan de miga de jamón y morrón
	Sándwich de miga de jamón y queso Tybo
	Pebete de jamón y queso Tybo
Empresa 8	Sándwich de miga de jamón y queso (*)
	Pebete pan francés de salame milan y queso
	Pebete de jamón y queso
	Sándwich pan árabe de jamón y queso

(*) Menús que se analizaron más de una vez en fechas diferentes.

De la empresa 1 sólo se tomaron y analizaron tres muestras ya que a partir de febrero del 2017 la misma dejó de suministrar alimentos para la venta en el comedor universitario.

Tabla 5: Materias primas proporcionadas por la empresa 7 y comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Empresas	Muestra
Empresa 7	Paleta cocida
	Queso tipo Tybo 1
	Queso tipo Tybo 2
	Queso tipo Tybo 3
	Queso tipo Tybo
Comedor	Carne picada cruda

Tabla 6: Superficies inertes muestreadas por el método del hisopo en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en noviembre de 2016

Superficies muestreadas	Antes de Limpieza y Sanitización	Después de Limpieza y Sanitización
Cuchillo cabo blanco con lámina ancha (lámina)	X	-----
Tabla de corte amarilla	X	X
Tabla de corte verde	X	X
Mesada 1	X	X
Mesada 2	X	X
Bandeja negra (horneado de empanadas)	X	X
Bandeja negra (horneado de milanesas)	X	
Cuchilla de licuadora	X	X
Espátula de metal	X	X
Azulejo puerta 2	X	X
Bandeja de menú	X	X
Cucharón de madera	X	X
Olla de aluminio (borde)	-----	X
Olla de aluminio (pared)	-----	X
Cajón blanco (borde)	-----	X
Cajón blanco (base)	-----	X
Bandeja descartable	X	-----

Tabla 7: Superficies vivas muestreadas por el método del hisopo en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en noviembre de 2016

Método de muestreo	Superficies muestreadas
Hisopado	Operario de cocina 1 sin guantes
	Expendedor 1 de menú con guantes
	Expendedor 2 de pan y fruta con guantes
	Expendedor 2 de pan y fruta sin guantes
	Repositor de verdura para ensaladas

Tabla 8: Determinación de *Staphylococcus aureus* en operarios del comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en noviembre de 2016

Determinación	Operarios
<i>Staphylococcus aureus</i>	Operario de cocina 1 sin guantes
	Expendedor 1 con guantes
	Operario de cocina 2 sin guantes
	Expendedor 2 de pan y fruta con guantes
	Repositor de verdura para ensaladas

Tabla 9: Determinación de hongos y levaduras en el ambiente del comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en noviembre de 2016

Determinación	Lugar de muestreo
Hongos y levaduras	Mesada lado este (debajo de ventana)
	Mesada 2
	Mesada anafe central
	Mesada 4
	Mesada lado noreste (debajo de ventana)

Tabla 10: Superficies inertes muestreadas por el método del hisopo en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en junio de 2017

Superficies muestreadas	Antes de Limpieza y Sanitización	Después de Limpieza y Sanitización
Cuchillo cabo blanco con lámina ancha (lámina)	X	-----
Cuchilla de multiprocesadora	X	X
Tabla de corte verde	X	X
Bandeja de acero inoxidable	X	X
Cuchillo con lámina dentada (lámina)	X	-----
Bandeja de plástico blanca	X	X
Mesada 1	X	X
Mesada 2	X	X
Cuchilla de licuadora	X	X
Azulejo puerta 2	X	-----
Bandeja negra (horneado de milanesas)	X	X
Bandeja negra (horneado de verduras)	X	
Bandeja de menú	X	X
Boca de entrada de cortadora de queso	X	X
Tabla de corte roja	-----	X
Mesada 4	-----	X

Tabla 11: Superficies vivas muestreadas por el método del hisopo en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en junio de 2017

Método de muestreo	Superficies muestreadas
Hisopado	Operario de cocina 1 con guantes
	Operario de cocina 2 sin guantes
	Expendedor de pan y fruta sin guantes
	Expendedor 1 de menú con guantes

Tabla 12: Determinación de *Staphylococcus aureus* en operarios del comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en junio de 2017

Determinación	Operarios
<i>Staphylococcus aureus</i>	Operario de cocina 1 sin guantes
	Expendedor de pan y fruta sin guantes
	Expendedor 2 de menú con guantes
	Operario de cocina 2 sin guantes
	Operario de cocina 3 sin guantes

Tabla 13: Determinación de hongos y levaduras en el ambiente del comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto en junio de 2017

Determinación	Lugar de muestreo
Hongos y levaduras	Mesada lado este (debajo de ventana)
	Mesada 2
	Mesada anafe central
	Mesada 4
	Mesada lado noreste (debajo de ventana)

4.2 Análisis microbiológico de alimentos

El análisis microbiológico de las muestras se realizó siguiendo la metodología analítica de las normas ISO, APHA e ICMSF.

4.2.1 Preparación del homogenato o suspensión inicial y las diluciones sucesivas de las muestras. Metodología analítica ICMSF: 2000

El homogenato (dilución 10^{-1}) se obtuvo mezclando $50 \text{ g} \pm 0,1$ representativo de la muestra a analizar con 450 ml del diluyente agua de peptona al 0,1%, contenidos en un recipiente adecuado para su homogenización. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos y a partir de esta dilución se tomó con pipeta un volumen de 10 ml y se colocó en un recipiente con 90 ml de diluyente para obtener así la dilución 10^{-2} . A partir de esta se tomó con pipeta 1 ml y se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua de peptona para obtener así la dilución 10^{-3} .

4.2.2 Recuento de enterobacterias. Metodología analítica: ISO 21528-2:2004

Se realizó recuento en placa en profundidad con agar Violeta-Rojo neutro-Bilis-Glucosa (VRBG) fundido y templado a $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Se tomó 1 ml de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , se depositó en placas de Petri vacías (siembra de las diluciones por duplicado), se adicionaron 15 ml del medio de cultivo, se homogeneizó con los movimientos correspondientes y se dejó solidificar. Luego se añadió a cada placa aproximadamente 10 ml del mismo medio de cultivo como capa virgen. Las placas de Petri se incubaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante $24 \pm 2 \text{ h}$ y se realizó el recuento presuntivo expresando el resultado como Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g) de muestra. Para confirmar que las colonias pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae*, se realizaron las pruebas bioquímicas de Oxidasa y Fermentación de glucosa.

4.2.3 Recuento de *Escherichia coli*. Metodología analítica: ICMSF 2000. Adaptación Método 2: Europeo

Se realizó por la Técnica de Número Más Probable (NMP) o Fermentación en Múltiples Tubos Clásico, utilizando caldo Mac Conkey como medio de enriquecimiento en tubos con campana Durham, sembrando la primera dilución decimal del alimento. Estos fueron incubados a $35\text{-}37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24-48 h y se consideraron tubos positivos (coliformes totales) aquellos en donde se observó turbidez, viraje del indicador y producción de gas. A partir de cada tubo positivo para coliformes totales, se procedió a efectuar el aislamiento en placas de Petri con agar Eosina-Azul de Metileno (EMB) y la posterior identificación de colonias características (negras/rojas con o sin brillo metálico) a través de las pruebas de Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer, Citrato (I.M.Vi.C.). El NMP de *E. coli* por g de alimento se determinó utilizando la tabla de NMP en función de los tubos de caldo Mac Conkey cuyas cepas presentes dieron positivas las pruebas bioquímicas correspondientes para esta bacteria.

4.2.4 Recuento de *Staphylococcus aureus*. Metodología analítica: ISO 6888-3:2003. Corrección 2004

Se realizó mediante la técnica de NMP modificado utilizando caldo Giolitti Cantoni como medio de enriquecimiento en tubos, sembrando las primeras tres diluciones decimales del alimento. Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 24-48 ± 2 h y se consideraron positivos aquellos donde se evidenció ennegrecimiento del medio de cultivo. A partir de estos se procedió a realizar el aislamiento en placas de Petri con agar Baird Parker y la posterior confirmación de colonias típicas (negras, brillantes, rodeadas de una zona translúcida que presentan un anillo opalescente) y/o atípicas (colonias negras menos oscuras, con una zona clara ausente y/o borde blanco ausente) por medio de la prueba de la coagulasa. Se calculó el NMP/g de la muestra basado en el número de tubos de cada dilución en los cuales se confirmó la presencia de *Staphylococcus aureus*.

4.2.5 Determinación de *Salmonella* spp. Metodología analítica: ISO 6579:2002

Se realizó la determinación de la presencia de *Salmonella* spp. en 25 g de muestra. El aislamiento y la identificación del microorganismo se realizaron en cinco pasos:

- Enriquecimiento no selectivo: se colocó 25 g de la muestra en 225 ml de Agua de Peptona Bufferada (APB). Se incubó a 34-38 °C durante 16-20 h.
- Enriquecimiento selectivo: se transfirió 1 ml del cultivo de enriquecimiento no selectivo en tubo con caldo Tetrionato y se incubó a 37 ± 1 °C, durante 24 ± 3 h. En otro tubo con 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis se traspasó 0,1 ml de APB y se incubó a 41,5 ± 1 °C durante 24 ± 3 h.
- Siembra en placas con medios de cultivo selectivos y diferenciales: a partir de los cultivos de enriquecimiento selectivo se sembró en estrías por agotamiento para obtener colonias aisladas en los medios:
 - Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato: colonias del mismo color que el medio de cultivo, transparentes. A veces con centro negro.
 - Agar Bismuto-Sulfito: colonias pardas, grises, tirando a negro con brillo metálico. El medio que las rodea es, por lo general, oscuro al principio volviéndose negro a medida que aumenta el período de incubación.

Las placas fueron incubadas a 37 ± 1 °C por 24-48 h. A partir de colonias típicas se realizaron las pruebas bioquímicas y serológicas correspondientes.

- Identificación por pruebas bioquímicas: a partir de cultivos puros se realizaron las pruebas I.M.Vi.C., Triple Sugar Iron (TSI), Fenilalanina, Urea y Descarboxilación de Lisina.

- Estudio de características serológicas: se realizó con las cepas que dieron pruebas bioquímicas típicas. El análisis antigénico se realizó por aglutinación somática empleando antisueros polivalentes OS-A y OS-B.

4.2.6 Recuento de *Clostridium perfringens*. Metodología analítica: Adaptación APHA:1992

Se tomó 1 ml de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} (por duplicado), se depositó en tubos conteniendo agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina fundido a 45-50 °C (siembra de las diluciones por duplicado), se homogeneizó el inóculo mediante agitación, se dejó solidificar y se añadió una capa de Vas-Par a cada tubo. Se incubaron los tubos a 35 °C por 24-48 h. Se realizó el recuento presuntivo de las colonias negras. Para confirmar estas colonias se tomaron 5 y se repicaron en tubos con caldo Tioglicolato o caldo Carne Cocida, se incubaron a 35 °C durante 18 a 24 h. Se realizó la coloración de Gram a partir de cada uno de estos. La presencia de microorganismos con la morfología correspondiente se confirmó por medio de pruebas metabólicas: hidrólisis de lecitina, coagulación de leche cisteinada, hidrólisis de gelatina, nitrato-movilidad, fermentación de azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa, rafinosa), producción de SH_2 , α -hemólisis. Se expresó el resultado como UFC/g de muestra.

4.2.7 Recuento de *Bacillus cereus*. Metodología analítica: ISO 7932:2004

Se realizó recuento en placa en superficie en agar Manitol-Yema de Huevo-Polimixina (MYP). Se tomó 0,1 ml de las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , se depositó en la superficie del agar en cada placa de Petri (siembra de las diluciones por duplicado) y se extendió el inóculo utilizando una espátula de Drigalsky. Las placas de Petri se incubaron a 30 °C durante 18-48 h, se realizó el recuento de colonias características (grandes, de color rosado, rodeadas de un halo denso de precipitación sobre un fondo rojo violáceo) y se procedió a la confirmación de estas colonias mediante la prueba de β -hemólisis en agar Sangre de Carnero. El resultado se expresó como UFC/g de muestra.

4.2.8 Determinación de *Escherichia coli* en 10 g de muestra. Metodología analítica: Adaptación ICMSF:2000

Se tomaron 10 g de alimento y se lo colocaron en 90 ml de caldo Mac Conkey simple concentración. Se incubó a 37 °C durante 24 h y se consideró positivo aquel frasco que presentó viraje del indicador. A partir de cada frasco positivo se procedió a efectuar el aislamiento en placas de Petri con agar EMB y la posterior identificación de

colonias características (negras/rojas con o sin brillo metálico) a través de las pruebas de I.M.Vi.C.

4.3 Análisis microbiológico de ambiente

4.3.1 Método del hisopo. Metodología analítica: ISO 18593:2004

Se pasó el hisopo, humedecido previamente, sobre la superficie a muestrear, luego se rotó y la porción no usada del hisopo se pasó nuevamente por la superficie.

Para superficies regulares inertes (tablas de corte, mesadas, azulejos, etc.) se delimitó una superficie de 100 cm² con una plancha de acero inoxidable o papel aluminio esterilizado, para superficies irregulares inertes (cuchillos, cuchilla de licuadora, espátula, etc.) se hisopó sin límite y para superficies vivas se seleccionaron manipuladores que están en contacto con los alimentos, con o sin guantes y se hisopó la mano hábil en su totalidad.

Luego se colocó el hisopo en un tubo que contenía 10 ml de diluyente (agua peptonada al 0,1 %). En caso de que fuera necesario se realizaron diluciones decimales y se realizó la siembra en placas (DIGESA, 2017).

4.3.2 Método del enjuague

Se introdujeron en el recipiente a muestrear, 100 ml del diluyente agua peptonada al 0,1%, se enjuagó el interior haciendo correr el líquido por toda la superficie, agitando correctamente. Se tomó 1 ml y se lo colocó en un tubo conteniendo 9 ml de solución diluyente obteniendo así la dilución 10⁻¹.

Se realizó el recuento de aerobios mesófilos viables totales y de enterobacterias y la determinación de *E. coli* en 1 ml.

El recuento de aerobios totales se realizó como se describe en el punto 4.3.4.

El recuento de enterobacterias se realizó como se describe en el punto 4.3.5.

La determinación de *E. coli* se realizó como se describe en el punto 4.3.8 (DIGESA, 2017; AMyD, 2017).

4.3.3 Método por contacto directo

Se determinó la presencia de *S. aureus* mediante la utilización de placas con agar Baird Parker. La muestra se tomó por contacto directo del medio de cultivo con la mano de uso predominante.

4.3.4 Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viables totales. Metodología Analítica ISO 4833-1:2003

Se tomó 1 ml de la muestra sin diluir y se depositó en placas de Petri vacías (siembra por duplicado), se adicionaron 12-15 ml del medio de cultivo Agar Plate Count (PCA) fundido y templado a 45 °C, se homogeneizó y se dejó solidificar. Las placas de Petri se incubaron a 30 ± 1 °C durante durante 72 ± 3 h y se realizó el recuento expresando el resultado como UFC/cm² o por superficie muestreada.

4.3.5 Recuento de enterobacterias. Metodología analítica: ISO 21528-2:2004.

Se tomó 1 ml de la muestra sin diluir y se depositó en placas de Petri vacías (siembra por duplicado), se adicionaron 15 ml del medio de cultivo VRBG fundido y templado a 45 ± 1 °C, se homogeneizó y se dejó solidificar. Luego se añadieron a cada placa aproximadamente 10 ml del mismo medio de cultivo como capa virgen. Las placas de Petri se incubaron a 37 °C durante 24 ± 2 h y se realizó el recuento presuntivo expresando el resultado como UFC/cm² o por superficie muestreada. Para confirmar que las colonias pertenecían a la familia *Enterobacteriaceae*, se realizaron las pruebas bioquímicas de Oxidasa y Fermentación de glucosa.

4.3.6 Recuento de coliformes totales. Metodología analítica: ISO 4832:2006

Se tomó 1 ml de la muestra sin diluir y se depositó en placas de Petri vacías (siembra por duplicado), se adicionó 15 ml del medio de cultivo agar Violeta-Rojo Neutro-Bilis–Lactosa (VRBL) fundido y templado a 45-50 °C, se homogeneizó y se dejó solidificar. Luego se añadió 10 ml a cada placa una capa del mismo medio de cultivo como capa virgen. Las placas de Petri se incubaron a 30 ± 1 °C durante 24 ± 2 h y se realizó el recuento expresando el resultado como UFC/cm² o por superficie muestreada.

4.3.7 Recuento de hongos y levaduras

Se realizó exposición de placas de Petri (90 mm) con agar Extracto de levadura-Glucosa-Cloranfenicol al ambiente de elaboración de menús y comidas preparadas listas para el consumo del comedor universitario, en diferentes tiempos (15 y 30 min). Las placas se incubaron a 25 °C durante 5 días y se realizó el recuento de hongos y levaduras expresando el resultado como número de hongos y levaduras por tiempo de exposición (Pasquarella y col., 2000).

4.3.8 Investigación de *Escherichia coli* en 1 g o ml de muestra. Metodología analítica adaptación ICMSF 2000

Se sembraron 10 ml de la dilución 10^{-1} (correspondiente a 1 g de muestra) o 1 ml de muestra en un tubo con 10 ml de caldo Mac Conkey (CMC) doble concentración en el primer caso y simple concentración en el segundo caso, con campana Durham. Se incubaron a 35-37 °C durante 24-48 h. Si en el tubo se observó turbidez y producción de gas, se tomó una ansada de este caldo y se sembró en estrías por agotamiento en agar Levine o EMB. Se incubó a 35-37 °C durante 24-48 h. Las colonias rojas con o sin brillo metálico se pasaron a tubos con agar Nutritivo inclinado, se incubó a 35 °C durante 24 h y se les efectuó las pruebas de identificación. Bacilos Gram (-) no esporulados cuyo I.M.Vi.C. es : ++-- corresponde a una *Escherichia coli* típica.

4.4 Análisis de datos

Todos los resultados obtenidos fueron procesados con el programa Microsoft Excel 2010.

5.1 Análisis microbiológico de comidas preparadas listas para el consumo

Las comidas preparadas listas para el consumo pueden contener una carga microbiana considerable debido a diferentes factores, como la calidad microbiológica de la materia prima e ingredientes utilizados, las condiciones higiénicas en las que se elaboran y manipulan los alimentos, las máquinas e instalaciones, los manipuladores de alimentos y el medio ambiente.

5.1.1 Alimentos listos para el consumo elaborados en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto

Se analizaron 21 muestras de comidas preparadas listas para el consumo elaboradas en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC). Los resultados obtenidos del análisis microbiológico se observan en la tabla 14.

El 100% de las muestras analizadas fueron aptas para el consumo, aunque 9 de ellas presentaron desarrollo de enterobacterias, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y/o *Bacillus cereus* por debajo de los límites establecidos por la normativa.

E. coli fue detectada en alimentos que tenían como guarnición ensalada de verduras crudas (arrollado de carne con verduras y ensalada de zanahoria y repollo, pollo al horno con ensalada de zanahoria y repollo, y pastel de carne con ensalada de zanahoria y repollo). Considerando que la comida lista para el consumo contenía materias primas crudas y cocidas se efectuó el análisis de una muestra de ensalada con verduras crudas con el fin de corroborar la presencia de *E. coli*. El recuento de este microorganismo en la ensalada fue similar a la de los alimentos analizados, por lo que se podría inferir que la carga de esta bacteria en los productos listos para consumir podría provenir del aporte de las verduras crudas.

Tabla 14: Análisis microbiológico de productos elaborados en el comedor de la UNRC

Muestra	Enterobacterias UFC/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>S. aureus</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> spp.	<i>B. cereus</i> UFC/g	<i>C. perfringens</i> UFC/g
Ravioles de ricota con salsa	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Milanese de cerdo con puré mixto	S/D	S/D	S/D	A	5 x 10	S/D
Polenta y albóndigas con salsa	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Milanese de cerdo con puré de papa	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Pollo al horno con ensalada de zanahoria y repollo	2 x 10 ³	2	S/D	A	N/D	S/D
Milanese de cerdo con puré de papa	S/D	0,4	S/D	A	S/D	S/D
Arrollado de carne relleno con verduras y ensalada de zanahoria y repollo	N/D	1,5	S/D	A	N/D	S/D
Pollo y fideos con verdura salteada	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Milanese de ternera con puré de papa	S/D	S/D	S/D	A	S/D	N/D
Milanese de ternera con arroz	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Pastel de carne	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Ensalada de lechuga y zanahoria con cebolla	N/D	1,1	7	A	N/D	N/D
Hamburguesas de carne con arroz y queso	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Milanese de cerdo con puré mixto	1,3 x 10 ³	1,1	4	A	S/D	S/D
Hamburguesas de carne con arroz primavera	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Pastel de carne con ensalada de repollo y zanahoria	N/D	2	S/D	A	S/D	S/D
Carré de cerdo con puré mixto	1,7 x 10 ³	S/D	2 x 10	A	S/D	S/D
Pollo y fideos con salsa	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Polenta y albóndigas con salsa	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Milanese de pollo con puré de papa	S/D	S/D	4	A	S/D	S/D
Milanese de ternera con arroz	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D

S/D= Sin Desarrollo

N/D= No Determinado

UFC= Unidades Formadoras de Colonias

A= Ausencia

NMP= Número Más Probable

Luego de realizar el recuento de enterobacterias y la determinación de ausencia o presencia de *E. coli* en 10 g en el arrollado de carne con verduras salteadas con características organolépticas no aceptables (color rojizo), no se observó desarrollo de ninguno de estos marcadores. En cuanto a la materia prima (carne picada cruda), se obtuvo un valor para enterobacterias de $1,9 \times 10^5$ UFC/g y un recuento de *E. coli* <3 NMP/g. Se determinó por lo tanto, que el arrollado de carne fue apto para consumo humano. La carne picada cruda, si bien presentó una carga importante de enterobacterias, se eliminaron tras el proceso de cocción.

5.1.2 Alimentos listos para el consumo elaborados por empresas de la ciudad de Río Cuarto y región

En la tabla 15 se observan los resultados obtenidos del análisis microbiológico de las comidas elaboradas por la Empresa 1 (E1).

Tabla 15: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 1

Muestra	Enterobacterias UFC/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>S. aureus</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> spp.	<i>B. cereus</i> UFC/g	<i>C. perfringens</i> UFC/g
Milanesa de pollo gratinada con papas fritas	$1,6 \times 10^3$	S/D	3	A	S/D	S/D
Ensalada de jamón cocido, queso Tybo, huevo duro, zanahoria cocida, arroz, papa hervida, pollo hervido	3×10^4	1,1	S/D	A	S/D	S/D
Costeleta de ternera con arroz y verdura	$1,3 \times 10^5$	0,4	$1,1 \times 10^3$	A	S/D	S/D

S/D= Sin Desarrollo
 N/D= No Determinado
 UFC= Unidades Formadoras de Colonias
 A= Ausencia
 NMP= Número Más Probable

A partir de los alimentos analizados se observó que dos de estos superaron el límite establecido de recuento de enterobacterias y uno mostró un alto recuento de *S. aureus*.

La presencia de enterobacterias podría deberse a las malas prácticas de higiene durante la preparación y el almacenamiento de los alimentos (Imperiale, 2017). Además, ambas comidas contenían diversas materias primas lo que aumenta el riesgo de contaminación y presencia del microorganismo.

El elevado recuento de *S. aureus* indicaría un manejo inadecuado del alimento, malas prácticas higiénicas por parte del manipulador y/o una posible contaminación cruzada.

5. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos del análisis microbiológico de las comidas preparadas por la empresa 2 (E2) se observan en la tabla 16.

Tabla 16: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 2

Muestra	Enterobacterias UFC/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>S. aureus</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> spp.	<i>B. cereus</i> UFC/g	<i>C. perfringens</i> UFC/g
Pionono de verduras (zanahoria, espinaca, cebolla)	1,5 x 10 ²	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Peceto y zapallitos con huevo	S/D	S/D	S/D	A	N/D	S/D
Bombas de carne con arroz integral	1,6 x 10 ³	S/D	2,3 x 10	A	S/D	S/D
Bombas de carne con arroz integral (*)	N/D	S/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Milanesas de berenjena con mil hojas	S/D	S/D	4	A	S/D	S/D

S/D= Sin Desarrollo

N/D= No Determinado

UFC= Unidades Formadoras de Colonias

A= Ausencia

NMP= Número Más Probable

(*)= Repetición de muestra

Las cinco muestras elaboradas por la E2 fueron aptas para el consumo humano. En una de estas (bombas de carne con arroz integral) se observaron recuentos de enterobacterias cercanos al valor máximo permitido por la normativa y también se detectó en bajos niveles la presencia de *S. aureus*, por lo cual se comunicó a la empresa la necesidad de realizar un nuevo análisis de este producto para verificar la fuente del contaminante. Esta muestra resultó apta para el consumo humano. Considerando que las bombas de carne fueron elaboradas con carne picada cubierta de puré de papa rebozado, la presencia de enterobacterias pudo deberse a que la temperatura de cocción no haya sido homogénea en todo el alimento o una contaminación post-elaboración. Además, la preparación de este producto requiere mucha manipulación por parte del elaborador, lo que explicaría la presencia de *S. aureus*.

Los resultados obtenidos del análisis microbiológico de las comidas preparadas por la empresa 3 (E3) se observan en la tabla 17.

Tabla 17: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 3

Muestra	Enterobacterias UFC/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>S. aureus</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> spp.	<i>B. cereus</i> UFC/g	<i>C. perfringens</i> UFC/g
Hamburguesas de carne vacuna con papas fritas	4×10^2	$>1,1 \times 10^2$	3	A	S/D	S/D
Milanesa de carne vacuna con guarnición (lentejas, arroz, zanahoria, tomate) (*)	N/D	S/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Tarta de jamón y queso (*)	N/D	S/D	N/D	N/D	N/D	N/D
Hamburguesa de pollo con remolacha y tomate	N/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Milanesa de ternera con ensalada (tomate, huevo duro, zanahoria)	N/D	S/D	$4,3 \times 10$	A	S/D	S/D
Canelones de verdura y carne	$5,6 \times 10^2$	S/D	$1,4 \times 10$	A	S/D	S/D

S/D= Sin Desarrollo

N/D= No Determinado

UFC= Unidades Formadoras de Colonias

A= Ausencia

NMP= Número Más Probable

(*)= Muestras control

De las seis muestras que se obtuvieron y analizaron de la E3, se observó que la hamburguesa de carne vacuna con papas fritas no fue apta para el consumo humano por superar el límite establecido para el recuento de *E. coli*. Esto podría deberse a que la carne picada es una materia prima que tiene alta carga microbiana, por lo que debe manipularse con medidas higiénicas estrictas y, además, tener una adecuada cocción. A partir de este resultado, la empresa derivó al Laboratorio de Microbiología de Alimentos, con un intervalo de 15 días, dos muestras de alimentos, milanesa con guarnición cuya materia prima fue carne vacuna y una tarta de jamón y queso para evaluar las condiciones generales de elaboración de los productos alimenticios. Como se observa en la tabla 17, se obtuvo un resultado negativo para ambas muestras, lo que implicaría que mejoraron las condiciones higiénico-sanitarias de preparación del alimento y/o su cocción.

Los resultados obtenidos del análisis microbiológico de las comidas preparadas por la empresa 4 (E4) se observan en la tabla 18.

Tabla 18: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 4

Muestra	Enterobacterias UFC/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>S. aureus</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> spp.	<i>B. cereus</i> UFC/g	<i>C. perfringens</i> UFC/g
Pebete de jamón y queso	9×10	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Empanadas de pollo	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D

5. Resultados y discusión

Sándwich pan de miga de jamón y queso	9 x 10	0,4	S/D	A	S/D	N/D
Pebete pan francés de jamón y queso	$2,7 \times 10^4$	S/D	$>1,1 \times 10^3$	A	S/D	S/D
Sacramento de jamón y queso	5 x 10	0,9	1,4 x 10	A	N/D	S/D
Empanadas árabes	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D

S/D= Sin Desarrollo

N/D= No Determinado

UFC= Unidades Formadoras de Colonias

A= Ausencia

NMP= Número Más Probable

Una de las seis muestras elaboradas por E4 (pebete de jamón y queso) superó el valor permitido por la normativa para enterobacterias y *S. aureus*.

Un estudio realizado por Kotzekidou (2013) mostró un recuento de enterobacterias promedio de $5,5 \times 10^4$ UFC/g y de 1×10^3 UFC/g para *S. aureus* en muestras de sándwiches, valores similares a los obtenidos en este estudio, además, en este trabajo se hizo hincapié en la importancia de la carga microbiológica inicial de las materias primas ya que estos alimentos no reciben tratamiento térmico antes del consumo, como así también, por la manipulación, procesamiento y condiciones de almacenamiento que sufre.

Estos resultados presentan gran relevancia, considerando la información proporcionada por el comedor universitario que menciona que los sándwiches constituyen una de las comidas preparadas listas para el consumo más elegidas por ser una opción rápida y accesible.

Los resultados obtenidos del análisis microbiológico de las comidas preparadas por la empresa 5 (E5) se observan en la tabla 19.

Tabla 19: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 5

Muestra	Enterobacterias UFC/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>S. aureus</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> spp.	<i>B. cereus</i> UFC/g	<i>C. perfringens</i> UFC/g
Ensalada (huevo duro, queso, zanahoria hervida, pollo hervido)	8×10^4	0,3	S/D	A	N/D	S/D
Guiso de lentejas	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Mayonesa de ave	S/D	S/D	$4,8 \times 10^2$	A	S/D	S/D
Canelones de carne y verdura	$3,2 \times 10^4$	1,1	$2,1 \times 10^2$	A	S/D	S/D
Arroz primavera	N/D	1,5	7,5 x 10	A	S/D	N/D
Bifes a la criolla	2×10^3	S/D	4	A	S/D	S/D

5. Resultados y discusión

S/D= Sin Desarrollo
 N/D= No Determinado
 UFC= Unidades Formadoras de Colonias
 A= Ausencia
 NMP= Número Más Probable

De los 6 alimentos producidos por la E5, en uno se observó un recuento que excedió el límite establecido por CAA para enterobacterias, otro mostró valores superiores al límite de recuento de *S. aureus* y en un tercer alimento fueron superados los límites establecidos para enterobacterias y *S. aureus*.

Los resultados obtenidos del análisis microbiológico de las comidas preparadas por la empresa 6 (E6) se observan en la tabla 20.

Tabla 20: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 6

Muestra	Enterobacterias UFC/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>S. aureus</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> spp.	<i>B. cereus</i> UFC/g	<i>C. perfringens</i> UFC/g
Sándwich de milanesa de carne vacuna con jamón y queso	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Sándwich pan de miga (salvado) de jamón y queso	$2,4 \times 10^3$	0,3	S/D	A	S/D	N/D
Pizzeta	S/D	0,4	$4,3 \times 10$	A	S/D	N/D
Sándwich pan de miga de bondiola y queso	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Pebete pan francés de milán y queso	$1,3 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^2$	4	A	S/D	S/D

S/D= Sin Desarrollo
 N/D= No Determinado
 UFC= Unidades Formadoras de Colonias
 A= Ausencia
 NMP= Número Más Probable

De las cinco muestras elaboradas por la E6, sólo una de ellas no fue apta para el consumo humano debido a que excedió el límite establecido de recuento de *E. coli*.

La presencia de esta bacteria indica que el producto alimenticio está contaminado con heces, por lo que el consumidor podría estar expuesto a patógenos entéricos cuando ingiere el alimento (Alonso y Poveda, 2008).

Los resultados obtenidos del análisis microbiológico de las comidas preparadas por la empresa 7 (E7) se observan en la tabla 21.

Tabla 21: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 7

Muestra	Enterobacterias UFC/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>S. aureus</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> spp.	<i>B. cereus</i> UFC/g	<i>C. perfringens</i> UFC/g
Sándwich pan árabe de jamón y queso	7×10^2	$> 1,1 \times 10^2$	S/D	A	5×10	S/D
Sándwich pan de miga de verdura y jamón cocido	N/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D
Sándwich pan árabe de jamón, queso, huevo duro y tomate	N/D	7,5	$1,5 \times 10$	A	S/D	S/D
Sándwich pan de miga de jamón y morrón	S/D	S/D	S/D	A	S/D	S/D

S/D= Sin Desarrollo

N/D= No Determinado

UFC= Unidades Formadoras de Colonias

A= Ausencia

NMP= Número Más Probable

De las cuatro muestras elaboradas por la E7, se observó que dos de ellas no fueron aptas para el consumo humano.

Debido a que el estudio del sándwich de pan árabe de jamón y queso mostró un alto recuento de *E. coli*, se solicitó a la empresa elaboradora nuevas muestras. La empresa envió las materias primas utilizadas en la preparación del alimento y nuevas muestras de sándwiches elaborados con las mismas. Se efectuaron los análisis correspondientes a las materias primas: paleta cocida y 3 muestras de diferentes quesos Tybo, uno de ellos utilizado en la elaboración del sándwich que presentó alto valor de *E. coli* (1), otro de la misma marca pero distinto lote (2) y una muestra de queso Tybo de una nueva marca (3). A su vez, se analizaron muestras de sándwiches listos para el consumo.

Los resultados obtenidos se observan en la tabla 22.

Tabla 22: Análisis microbiológico de materias primas y muestras enviadas por la E7

Muestra	Enterobacterias UFC/g	Coliformes totales NMP/g	<i>E. coli</i> NMP/g
Paleta cocida	N/D	$1,1 \times 10^2$	S/D
Queso Tybo 1	N/D	$1,1 \times 10^4$	9
Queso Tybo 2	N/D	$2,4 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$
Queso Tybo 3	N/D	0,4	S/D
Sándwich de miga de jamón y queso Tybo 1	$6,5 \times 10^2$	$>1,1 \times 10^2$	$1,2 \times 10$
Pebete de jamón y queso Tybo 1	$1,8 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^2$	0,3
Sándwich pan árabe de jamón y queso Tybo 1	$1,1 \times 10^3$	$>1,1 \times 10^2$	1,1
Sándwich pan árabe de jamón y queso Tybo 3	S/D	0,7	0,3

S/D= Sin Desarrollo
 N/D= No Determinado
 UFC= Unidades Formadoras de Colonias
 NMP= Número Más Probable

De las muestras analizadas, se observó que la paleta cocida fue apta para el consumo. Las muestras de queso Tybo 1 y 2 no fueron aptas para el consumo humano por exceder los límites establecidos para coliformes totales y *E. coli*. En las tres muestras de sándwiches elaborados con el queso Tybo 1, se observaron recuentos cerca de los límites establecidos tanto para enterobacterias como para *E. coli* y una de ellas presentó valores de recuento de *E. coli* que excedieron el límite establecido por normativa. Si bien el CAA no especifica la determinación del número de coliformes totales para comidas preparadas, se realizó el recuento de los mismos ya que brindan información adicional para corroborar la deficiente calidad microbiológica del producto.

Tanto la muestra de queso Tybo 3 como el sándwich elaborado con él, fueron aptos para el consumo humano.

A partir de estos resultados se pudo determinar que el queso Tybo 1 y 2, de la misma marca, fue la materia prima que aportó el alto número de *E. coli*, por lo que la empresa continuó la elaboración de todos los tipos de sándwich con el queso Tybo 3.

Al cabo de 10 meses, una muestra de sándwich de pan árabe de jamón, queso, huevo duro y tomate elaborado por la misma empresa, presentó recuento de *E. coli* que sobrepasó el límite establecido por normativa nacional, por lo tanto se solicitó a la empresa que enviara una nueva muestra del queso Tybo y una muestra del mismo sándwich. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 23.

Tabla 23: Análisis microbiológico de materia prima y muestra enviadas por la E7

Muestra	Enterobacterias UFC/g	Coliformes totales NMP/g	<i>E. coli</i> NMP/g
Queso Tybo	S/D	4,8 x 10	S/D
Sándwich pan árabe de jamón, queso, huevo duro y tomate	S/D	9,3	S/D

S/D= Sin Desarrollo
 N/D= No Determinado
 UFC= Unidades Formadoras de Colonias
 NMP= Número Más Probable

Las dos muestras fueron aptas para el consumo humano. Esto evidenciaría que el queso no incidió en la deficiente calidad higiénico-sanitaria de la comida lista para el consumo. Con estos resultados se sugirió a la empresa verificar los procedimientos de higiene en la elaboración de productos y de sus manipuladores.

5. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos del análisis microbiológico de las comidas preparadas por la empresa 8 (E8) se observan en la tabla 24.

Tabla 24: Análisis microbiológico de productos elaborados por la Empresa 8

Muestra	Enterobacterias UFC/g	<i>E. coli</i> NMP/g	<i>S. aureus</i> NMP/g	<i>Salmonella</i> spp.	<i>B. cereus</i> UFC/g	<i>C. perfringens</i> UFC/g
Sándwich pan de miga de jamón y queso	$3,3 \times 10^2$	$>1,1 \times 10^2$	2×10	A	S/D	S/D
Pebete pan francés de salame milan y queso	$4,5 \times 10^4$	0,11	1×10^3	A	S/D	S/D
Pebete de jamón y queso	S/D	1,5	9	A	S/D	S/D
Sándwich pan de miga de jamón y queso	$2,9 \times 10^4$	0,3	$2,8 \times 10$	A	S/D	S/D
Sándwich pan árabe de jamón y queso	$2,1 \times 10^2$	$>1,1 \times 10^2$	7	A	S/D	S/D

S/D= Sin Desarrollo

N/D= No Determinado

UFC= Unidades Formadoras de Colonias

A= Ausencia

NMP= Número Más Probable

De las cinco muestras elaboradas por la empresa E8, cuatro no fueron aptas para el consumo. Dos de ellas excedieron el límite establecido de recuento de enterobacterias y, a su vez, una excedió el límite establecido para *S. aureus*. Las dos muestras restantes sobrepasaron el límite establecido para *E. coli*.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fang y col. (2003), quienes reportaron que en el 10% de las muestras de sándwiches analizadas se detectó la presencia de *E. coli* en un rango de 2×10^2 - 1×10^4 UFC/g, y en el 11,9% se detectó *S. aureus* en un rango de 2×10^2 - 1×10^5 UFC/g. Además, coinciden con los resultados obtenidos por Imperiale y col. (2017), los cuales mostraron que tras evaluar treinta muestras de sándwiches de cafés locales en Turin (Italia), once muestras presentaron recuentos de enterobacterias entre 10^3 y 10^7 UFC/g y dos muestras recuentos de *E. coli* entre 10 y $<10^3$ UFC/g.

El control microbiológico de las 45 muestras de comidas listas para el consumo elaborados por las ocho empresas de la ciudad de Río Cuarto proveedoras del comedor universitario, reveló que el 66,67% (30 muestras) fueron aptas para el consumo humano y el resto no aptas.

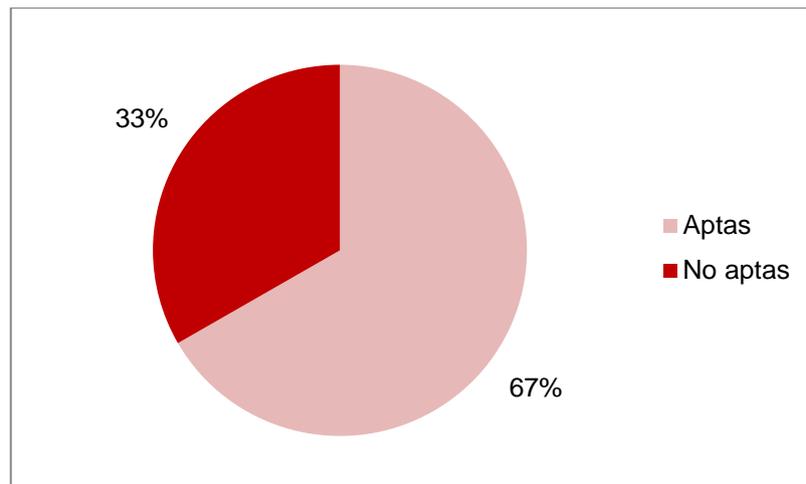


Figura 2: Aptitud de consumo humano del total de muestras elaboradas por las ocho empresas analizadas

El director técnico es corresponsable con el propietario del establecimiento de elaboración de alimentos del cumplimiento de las normas vigentes en materia alimentaria. El Reglamento Bromatológico de la Municipalidad de Río Cuarto (Capítulo II, art. 104), establece que la Dirección Bromatológica Municipal (ámbito de contralor oficial) requiere la implementación de la dirección técnica de los establecimientos elaboradores de alimentos, la cual es realizada por profesionales o técnicos con orientación en Higiene y Seguridad Alimentaria (director técnico) con la finalidad de capacitar al personal en higiene y manipulación de alimentos, diseñar, implementar y mantener el cumplimiento de las BPM y POES.

5.2 Evaluación total de muestras analizadas listas para el consumo expandidas en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto

De 67 muestras de alimentos tomadas y analizadas en este estudio (correspondientes a las 8 empresas externas más las elaboradas en el comedor universitario), el 77,6% de las mismas (52 muestras) fueron aptas para el consumo humano, mientras que el 22,4% (15 muestras) que no fueron aptas (figura 3).

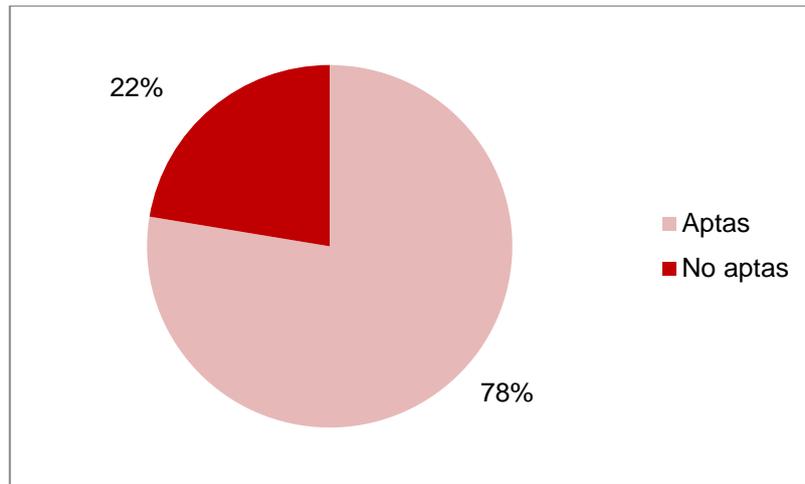


Figura 3: Aptitud de consumo humano del total de muestras elaboradas por las ocho empresas y por el comedor universitario

Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos por Otonello (2017), donde el 68% de las muestras analizadas en el año 2015 presentaron una calidad microbiológica aceptable. En el año 2017, este porcentaje subió a casi un 80%, y, en consecuencia, disminuyó el de alimentos no aptos en la misma proporción.

La deficiente calidad microbiológica que presentaron las 15 muestras no aptas para consumo se debió a elevados recuentos de enterobacterias, *E. coli* y *S. aureus*. En la figura 4 se observa el porcentaje de muestras que excedieron los distintos límites establecidos por la normativa vigente.

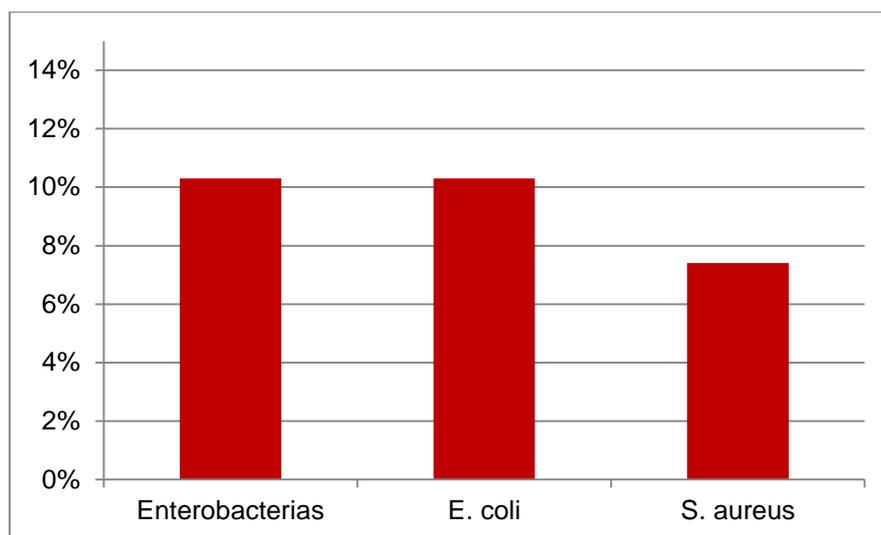


Figura 4: Porcentaje de muestras que superaron los límites establecidos para distintos marcadores

Un 10,3% de las muestras no fueron aptas para el consumo humano por presentar un alto recuento de enterobacterias. Este grupo bacteriano constituye el indicador de

higiene más apropiado según las normas internacionales, tanto para productos como para ambiente, ya que es la más inclusiva para bacterias patógenas de origen fecal y no fecal, por lo que su presencia en números altos indica mala calidad higiénica, procesamiento inadecuado o contaminación posterior de los alimentos, así como también una posible contaminación fecal (Weber y col., 2009; Takahashi y col., 2017).

Otro 10,3% presentó una calidad microbiológica inaceptable por elevado recuento de *E. coli*. Teniendo en cuenta que es un microorganismo cuyo hábitat natural es el tracto intestinal del hombre y de otros animales de sangre caliente, se considera que es un indicador de contaminación directa o indirecta de origen fecal y esto, a su vez, puede implicar la presencia simultánea de microorganismos patógenos. Además, su presencia está influenciada por otros factores como la deficiencia en la higiene del equipo, de las superficies que están en contacto con el alimento en cualquier etapa del proceso productivo o del manipulador de alimentos (Alonso y Poveda, 2008; FCEN, 2013).

Por último, un 7,5% presentó altos valores de recuento de *S. aureus*. Este microorganismo puede colonizar la piel y fosas nasales de los manipuladores de alimentos, pero también puede persistir en el ambiente, por lo tanto, su presencia podría asociarse a una contaminación cruzada por un inadecuado manejo durante todo el proceso productivo (desde la recepción de las materias primas hasta su expendio), o a la contaminación de los equipos y/o superficies que están en contacto con las manos de los manipuladores o con materia prima contaminada (Kotzekidou, 2013; Castro y col., 2016). A su vez, en las comidas listas para el consumo con proceso de cocción (E1 y E5), la presencia de este microorganismo podría deberse a una falla en el mismo (Balzaretto y Marzano, 2013).

En la figura 5 se observa el número de muestras de cada una de las empresas proveedoras que superaron los límites establecidos para las determinaciones microbiológicas realizadas.

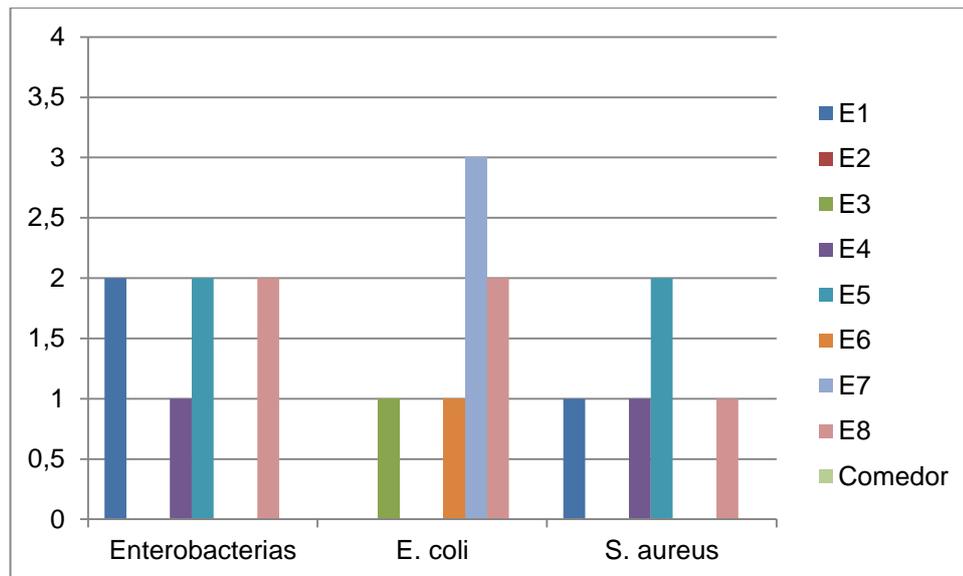


Figura 5: Número de muestras de las distintas empresas y comedor universitario que superaron los límites establecidos para diferentes determinaciones microbiológicas

El 44% de las empresas (E1, E4, E5 y E8) excedió los límites establecidos por la normativa vigente para recuento de enterobacterias. Otro 44% (E3, E6, E7 y E8) presentó recuentos elevados de *E. coli*, mientras que las empresas E1, E4, E5 y E8 presentaron altos valores de recuento de *S. aureus*. El 100% de las muestras elaboradas por la empresa E2 y el comedor universitario fueron aptas para el consumo humano.

En ninguna muestra analizada se detectó la presencia de *Salmonella* spp. ni *Clostridium perfringens*. En cuanto a *B. cereus*, se detectó en dos muestras pero no superó el límite establecido por el CAA. Estos resultados se correlacionan con los de Aycicek y col. (2004b). La ausencia de *Salmonella* spp. fue reportada por Modzelewska-Kapitula y Maj-Sobotka (2014), Balzaretti y Marzano (2013), Öz y col. (2014) y por Rodríguez y col. (2011), en concordancia con este estudio, mientras que difiere de los resultados obtenidos por Yam-Fung Ng (2013), que detectó *Salmonella* spp. en un 39% de las muestras y por Christison y col. (2008), quienes aislaron esta bacteria en un 16%.

En un estudio realizado en Estambul (Turquía), de 750 muestras de alimentos listos para el consumo, se observó que el 93,3% fue apto para el consumo humano y el 6,7% no fue apto por sobrepasar los límites establecidos por el Reglamento del Codex Alimentario Turco sobre Criterios Microbiológicos (sus siglas en inglés, TFC) para recuento de *E. coli*, *S. aureus* y *B. cereus* (Öz y col., 2014). Estos resultados coinciden con los obtenidos en esta investigación.

Además, Aycicek y col. (2004b), realizaron una evaluación de la calidad microbiológica de las comidas preparadas en las salas de servicio de un hospital militar

de Ankara (Turquía) y reportaron que el 91% de muestras de platos principales, el 68,6% de ensaladas y todas las muestras de arroz y sopa fueron de calidad microbiológica aceptable de acuerdo con el TFC. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en este estudio.

En una investigación realizada en Taiwán, se determinó la calidad microbiológica de productos alimenticios listos para el consumo (a 18 °C) vendidos al por menor y se encontró que la incidencia de *E. coli* fue del 7,9%, mientras que el 49,8% y el 17,9% de las muestras presentaron *B. cereus* y *S. aureus*, respectivamente (Fang y col., 2003). Los resultados para *E. coli* y *S. aureus* fueron similares a los obtenidos a partir del estudio realizado en el comedor universitario, a diferencia de los mostrados para *B. cereus*, ya que ninguna muestra superó el límite establecido por CAA.

Efectuando una cronología de los resultados obtenidos a partir de estudios realizados en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos entre 2004 y 2017 sobre la aptitud de alimentos para el consumo humano expendidos en el comedor universitario, se puede observar que año a año el porcentaje de aptitud de las muestras fue en aumento conjuntamente con el crecimiento del comedor tanto en estructura como en el nivel de capacitación de los operarios del sector cocina.

Coria (2005) registró que el 31,6% de los alimentos elaborados en el comedor de la UNRC fue apto para el consumo, mientras que Pasetti (2009) mostró aptitud en el 20% de las muestras. Gnesutta (2010) observó que de un total de 5 muestras, el 60% de las mismas fue apto para consumo. Según Lerda (2010), de 7 muestras, el 71,4% no superó los límites establecidos por el CAA. Los resultados obtenidos por Yachecen (2012) muestran que de un total de 15 muestras, el 40% fueron aptas. Según Cantarutti (2015) y Otonello (2017), el 100% de las muestras fue apto para el consumo humano. Estos últimos resultados fueron coincidentes con los obtenidos en este estudio, ya que a partir del control microbiológico de 22 muestras de alimentos y de 1 muestra de materia prima se observó que el 100% fue apto para el consumo humano. Esto reveló un proceso constante de control y educación efectuado por la responsable técnica del comedor universitario y por los profesionales del Laboratorio de Microbiología de Alimentos para el mejoramiento continuo de la calidad de productos alimenticios que se expenden en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

En cuanto al análisis microbiológico de comidas elaboradas en empresas proveedoras del comedor universitario, en el año 2005 no se registraron datos. El estudio realizado por Pasetti (2009) demostró que ninguna de las muestras analizadas fueron aptas para el consumo humano. En otro estudio se observó que de un total de 18

muestras analizadas, el 16% de las mismas fue apto para consumo (Gnesutta, 2010). Según Lerda (2010), el 33% cumplió con los criterios microbiológicos de la normativa vigente. Los resultados obtenidos por Yachecen (2012) fueron similares a los obtenidos por Lerda (2010), ya que de un total de 31 muestras, el 23% de las mismas fueron aptas para consumo humano. En el estudio realizado por Cantarutti (2015) se observó que de 27 muestras de alimentos, el 74% de ellas (20 muestras) no superaban los límites establecidos por el CAA. Según Otonello (2017), de un total de 28 muestras, el 60,7% (17 muestras) fue apto mientras que el 39,3% restante (11 muestras) no fue apto. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en este estudio, ya que a partir del control microbiológico de 45 muestras de alimentos elaborados por ocho empresas proveedoras se observó que el 67% (30 muestras) fue apto para el consumo humano.

Es importante destacar que en los últimos años la tecnología y el conocimiento en lo referente a producción de alimentos, su control y su manipulación han producido cambios positivos, imponiendo reformas ágiles y accesibles de formación, educación y concientización, aumentando el grado de compromiso con la tarea y, consecuentemente, con la salud de la población.

5.3 Análisis microbiológico de muestras ambientales

5.3.1 Análisis microbiológico de superficies inertes del comedor de la UNRC

En el año 2016, se realizó control microbiológico de una bandeja descartable de comida para llevar, con tapa, para verificar si la misma realiza aporte de carga microbiana a la muestra de menú tomada para su análisis en el laboratorio. El recuento de aerobios totales (RAT) fue de $6,3 \times 10^4$ UFC/ml y no se detectó la presencia de enterobacterias ni de *E. coli*, por lo tanto se pudo demostrar que este elemento no influyó en la calidad microbiológica final del alimento muestreado.

Los resultados obtenidos del estudio de superficies inertes por el método del hisopado del sector cocina del comedor universitario para los dos muestreos realizados (noviembre de 2016 y junio de 2017) se observan en las tablas 25 y 26. Se analizaron los siguientes marcadores: RAT, enterobacterias y coliformes totales, antes y después de la limpieza y sanitización.

5. Resultados y discusión

Tabla 25: Análisis microbiológico de superficies inertes del comedor universitario por método de hisopado (noviembre 2016)

Superficie muestreada	Antes de Limpieza y Sanitización			Después de Limpieza y Sanitización		
	RAT UFC/cm ²	Enterobacterias UFC/cm ²	Coliformes Totales UFC/cm ²	RAT UFC/cm ²	Enterobacterias UFC/cm ²	Coliformes Totales UFC/cm ²
Cuchillo cabo blanco con lámina ancha (lámina)	1,6 x 10 ⁴ (*)	5,6 x 10 ³ (*)	6,6 x 10 ² (*)	N/D	N/D	N/D
Tabla de corte amarilla	6,4 x 10 ²	4,3 x 10 ²	1,1 x 10 ²	1,8 x 10	1,1 x 10	9
Tabla de corte verde	6,5 x 10 ²	4,5 x 10 ²	3,2 x 10 ²	4,8 x 10 ²	3 x 10 ²	1,6 x 10 ²
Mesada 1	2 x 10	3	0,2	S/D	S/D	S/D
Mesada 2	3,8 x 10	7	2	S/D	S/D	S/D
Bandeja negra (horneado de empanadas)	1	S/D	S/D	S/D	S/D	S/D
Bandeja negra (horneado de milanesas)	S/D	S/D	S/D			
Cuchilla de licuadora	4,8 x 10 ³ (*)	4,1 x 10 ² (*)	1,7 x 10 ² (*)	1,8 x 10 ² (*)	3 x 10 (*)	1 x 10 (*)
Espátula de metal	1,3 x 10 ³ (*)	S/D	S/D	3 x 10 (*)	S/D	S/D
Azulejo puerta 2	1,8 x 10	S/D	S/D	2	S/D	S/D
Bandeja de menú	2,4 x 10	S/D	S/D	1,1 x 10	S/D	S/D
Cucharon de madera	2,6 x 10 ⁴ (*)	1,6 x 10 ⁴ (*)	1,3 x 10 ⁴ (*)	2,8 x 10 ² (*)	1 x 10 (*)	S/D
Olla de aluminio (borde)	N/D	N/D	N/D	3,7 x 10 ² (*)	S/D	S/D
Olla de aluminio (pared)	N/D	N/D	N/D	S/D	S/D	S/D
Cajón blanco (borde)	N/D	N/D	N/D	1,7 x 10 ⁴ (*)	S/D	S/D
Cajón blanco (base)	N/D	N/D	N/D	1 x 10	S/D	S/D

S/D= Sin Desarrollo

N/D= No Determinado

RAT= Recuento de microorganismos Aerobios mesófilos viables Totales

UFC= Unidades Formadoras de Colonias

(*)= UFC/ superficie muestreada

Tabla 26: Análisis microbiológico de superficies inertes del comedor universitario por método de hisopado (junio 2017)

Superficie muestreada	Antes de Limpieza y Sanitización			Después de Limpieza y Sanitización		
	RAT UFC/cm ²	Enterobacterias UFC/cm ²	Coliformes Totales UFC/cm ²	RAT UFC/cm ²	Enterobacterias UFC/cm ²	Coliformes Totales UFC/cm ²
Cuchillo cabo blanco con lámina ancha (lámina)	8,2 x 10 ³ (*)	9,8 x 10 ² (*)	2 x 10 (*)	N/D	N/D	N/D
Cuchilla de multi-procesadora	8,7 x 10 ³ (*)	4,5 x 10 ² (*)	7 x 10 (*)	7 x 10 (*)	S/D	S/D
Tabla de corte verde	8,3 x 10 ²	1,6 x 10 ²	7,4 x 10	4 x 10 ²	1,1 x 10 ²	9
Bandeja de acero inoxidable	4,5 x 10 ⁴ (*)	4,5 x 10 ² (*)	S/D	1,7 x 10 ² (*)	2 x 10 (*)	S/D
Cuchillo pequeño con lámina dentada (lámina)	5,4 x 10 ³ (*)	1,3 x 10 ³ (*)	1,5 x 10 (*)	N/D	N/D	N/D
Bandeja de plástico blanca	7,4 x 10 ²	9,2	3	3	S/D	S/D
Mesada 1	1,5 x 10 ²	4,7 x 10	1,1 x 10	0,5	S/D	S/D
Mesada 2	2,2 x 10	2 x 10	8,6	2,5	S/D	S/D
Cuchilla de licuadora	1,5 x 10 ⁴ (*)	6,4 x 10 ³ (*)	2,8 x 10 ² (*)	3,6 x 10 ² (*)	1 x 10 (*)	1 x 10 (*)
Azulejo puerta 2	1,7	S/D	S/D	N/D	N/D	N/D
Bandeja negra (horneado de milanesas)	5,4	S/D	S/D	5	S/D	S/D
Bandeja negra (horneado de verduras)	4,5 x 10	0,3	S/D			
Bandeja de menú	1,9 x 10 ³ (*)	S/D	S/D	5,8 x 10 ² (*)	S/D	S/D
Boca de entrada de cortadora de queso	4,5 x 10 ⁴ (*)	1,5 x 10 (*)	S/D	2,9 x 10 ³ (*)	1 x 10 (*)	S/D
Tabla de corte roja	N/D	N/D	N/D	2,8 x 10 ²	1,4 x 10 ²	5,4 x 10
Mesada 4	N/D	N/D	N/D	4	S/D	S/D

S/D= Sin Desarrollo

N/D= No Determinado

RAT= Recuento de microorganismos Aerobios mesófilos viables Totales

UFC= Unidades Formadoras de Colonias

(*)= UFC/ superficie muestreada

A partir de estos resultados podría decirse que para todas las muestras de superficies inertes analizadas los recuentos de los tres marcadores disminuyeron entre 1 y 2 logaritmos luego de la limpieza y sanitización, demostrando la efectividad de los tratamientos empleados.

En la figuras 6 y 7 se observa la disminución de los porcentajes de detección de los tres indicadores, luego del proceso de higiene, en los años 2016 y 2017, respectivamente.

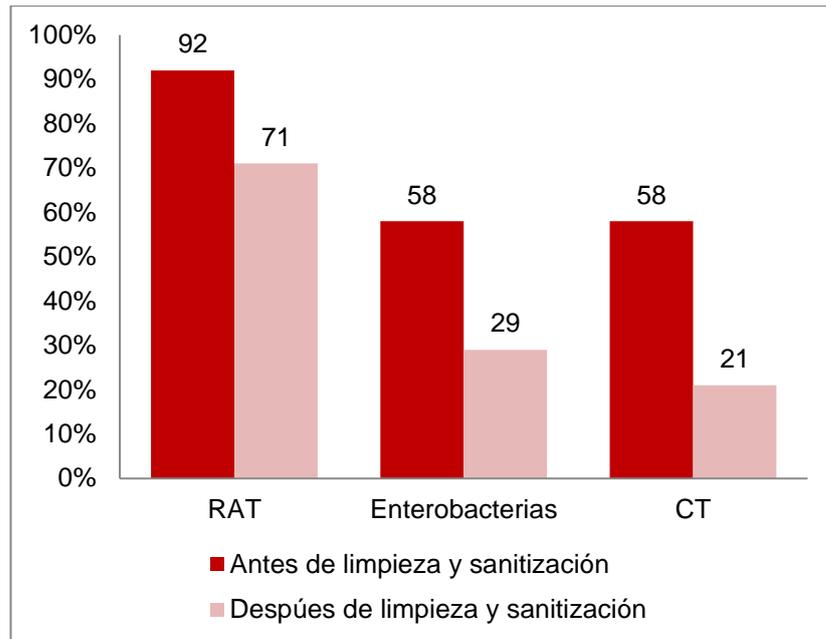


Figura 6: Porcentaje de detección de los indicadores en superficies inertes antes y después del proceso de limpieza y sanitización en el año 2016

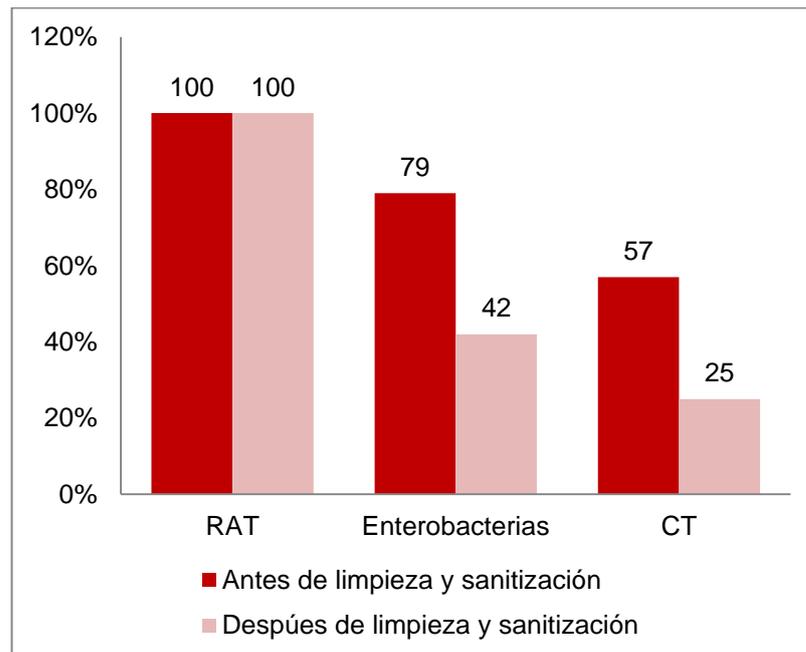


Figura 7: Porcentaje de detección de los indicadores en superficies inertes antes y después del proceso de limpieza y sanitización en el año 2017

De 26 muestras que se analizaron en el 2016, en 11 de ellas se detectó la presencia de enterobacterias (42,31%) con recuentos entre 1×10^1 - $1,6 \times 10^4$ UFC/cm² o UFC/superficie muestreada. De 26 muestras que se analizaron en el 2017, en 16 de ellas se detectó la presencia de enterobacterias (61,54%) con recuentos que van desde 1 a $6,4 \times 10^3$ UFC/cm² o UFC/superficie muestreada. Valero y col. (2017) reportaron que el

26,2% de las superficies en contacto con alimentos presentaron enterobacterias con recuentos entre $1 \times 10^1 - 2 \times 10^2$ UFC/superficie muestreada, mientras que Djekic y col. (2016) el 18%, ambos porcentajes se encuentran por debajo de los obtenidos en el presente estudio.

El CAA en el capítulo II, anexo I punto 5.3, expresa que cada establecimiento deberá asegurar su limpieza y desinfección pero no se han establecido límites reglamentarios para las superficies que están en contacto con los alimentos. Losito y col. (2017), realizaron un estudio de ambiente en distintos establecimientos elaboradores y/o expendedores de alimentos, donde recolectaron muestras de superficies desinfectadas mediante el método de hisopo antes de entrar en contacto con cualquier tipo de alimento y se les realizó recuento de aerobios totales. A partir de los datos obtenidos, clasificaron las superficies en tres categorías: conformes (no detectables hasta 49 UFC/cm²), medianamente conformes (entre 50 y 499 UFC/cm²) y no conformes (> 500 UFC/cm²). Estos criterios de cumplimiento fueron seleccionados debido a que son prácticos, realizables y verificables para la evaluación del programa de higiene en la industria alimentaria como así también en el sistema de distribución de alimentos.

Considerando solamente las muestras que se tomaron luego de la higiene y de acuerdo a los criterios mencionados anteriormente, en el muestreo ambiental del comedor universitario de 2016, el 64% de las muestras fueron conformes, el 20% medianamente conformes y el 7% no conformes, y en el muestreo ambiental de 2017 se observó que el 42% fueron conformes, el 42% medianamente conformes y el 16% no conformes. El establecimiento deli, sitio de expendio de productos listos para el consumo, presentó resultados similares a los obtenidos a partir del comedor de la UNRC.

Osimani y col. (2014) analizaron superficies de la cocina de comedor universitario después de la limpieza y sanitización (tablas de corte de carne cruda y tablas de corte multiusos). Los valores de recuento de aerobios totales y de coliformes totales obtenidos son coincidentes con los resultados presentados para las tablas de corte pertenecientes al comedor de la UNRC. Cabe destacar que estas tablas están fabricadas con material sintético poroso particularmente dañado (con cortes y grietas) por el uso prolongado, lo que hace particularmente problemática la limpieza y el saneamiento adecuados.

A partir de los resultados mostrados en la tabla 25 y 26, los valores obtenidos difieren con los de Christison y col. (2008) que realizaron un estudio microbiológico de las superficies de preparación de las comidas tipo delicatessen en Johannesburgo (Sudáfrica) y demostraron que las tablas de corte después de la limpieza y sanitización

presentaron valores de recuento de aerobios totales y de coliformes totales por encima de los obtenidos en el presente estudio.

Los estándares microbiológicos de Dancer (2004) para evaluar la aceptabilidad de las superficies en contacto con los alimentos luego de la limpieza y sanitización, establecen un recuento de aerobios totales inferior a 5 UFC/cm² y de microorganismos indicadores inferior a 1 UFC/cm². Tomando como referencia estos estándares, en el presente estudio se obtuvieron valores de RAT y de enterobacterias aceptables para las mesadas de trabajo analizadas. Por el contrario, se encontraron cargas superiores a los valores estándar de estos marcadores en las tablas de corte (RAT entre 1,8 x 10 y 4,8 x 10² UFC/cm² y para enterobacterias valores comprendidos entre 1,1 x 10 y 3 x 10² UFC/cm²). Estos altos valores se corresponden con los obtenidos por Rodríguez y col. (2011) que realizaron un estudio microbiológico de las superficies de trabajo de las áreas de procesamiento de un hospital en el sur de España y evaluaron su aceptabilidad de acuerdo a los estándares de Dancer.

5.3.2 Análisis microbiológico de superficies vivas del comedor de la UNRC

Los resultados obtenidos del análisis microbiológico se muestran en las tablas 27 y 28.

Tabla 27: Análisis microbiológico de superficies vivas del comedor universitario por método de hisopado - Año 2016

Superficie muestreada	Antes de Limpieza y Sanitización		
	RAT UFC/mano	Enterobacterias UFC/mano	Coliformes Totales UFC/mano
Cocinero sin guantes	2 x 10 ⁴	S/D	S/D
Expendedor 1 de menú con guantes	7,5 x 10 ²	S/D	S/D
Expendedor 2 de pan y fruta con guantes	1,4 x 10 ⁴	2,8 x 10 ³	1,4 x 10 ³
Expendedor 2 de pan y fruta sin guantes	2,6 x 10 ⁴	4,8 x 10 ²	2 x 10 ²
Repositor de verdura para ensaladas	2,2 x 10 ⁴	6,1 x 10 ³	5,7 x 10 ²

S/D= Sin Desarrollo

RAT= Recuento de microorganismos Aerobios mesófilos viables Totales

UFC= Unidades Formadoras de Colonias

Tabla 28: Análisis microbiológico de superficies vivas del comedor universitario por método de hisopado – Año 2017

Superficie muestreada	Antes de Limpieza y Sanitización		
	RAT UFC/mano	Enterobacterias UFC/mano	Coliformes Totales UFC/mano
Operario de cocina 1 con guantes	$1,3 \times 10^3$	S/D	S/D
Operario de cocina 2 sin guantes	$1,6 \times 10^4$	S/D	S/D
Expendedor de pan y fruta sin guantes	$3,8 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
Expendedor 1 de menú con guantes	4×10^2	5	5

S/D= Sin Desarrollo

RAT= Recuento de microorganismos Aerobios mesófilos viables Totales

UFC= Unidades Formadoras de Colonias

El 100% de los operarios analizados mostraron resultados positivos para al menos uno de los marcadores estudiados (RAT, enterobacterias, coliformes totales).

El 100% de las muestras tomadas y analizadas de manos presentaron RAT, resultado coincidente con el estudio realizado por Lues y Van Tonder (2007), donde el 98% de muestras de manos de manipuladores de alimentos mostraron recuentos de aerobios mesófilos totales.

El 60% de las muestras tomadas en el año 2016 mostraron altos recuentos de enterobacterias, mientras que las correspondientes al año 2017, presentaron resultados similares en un 50%. Estos altos recuentos son coincidentes con los obtenidos por Valero y col. (2017) (62,1% de las muestras) y fueron notablemente mayores que los reportados por Djekic y col. (2016) y por Lues y Van Tonder (2007), donde los altos valores de enterobacterias estuvieron presentes en las muestras de manipuladores de alimentos en un 12,5% y en un 44%, respectivamente.

En el año 2016, tres de las cinco muestras (60%) tuvieron altos recuentos de coliformes totales y en el año 2017, dos de las cuatro muestras (50%). En el estudio realizado por Lues y Van Tonder (2007) los coliformes estaban presentes en el 40% de las manos de los manipuladores de alimentos.

La determinación de *Staphylococcus aureus* en manos de los manipuladores del comedor universitario se muestra en las tablas 29 y 30.

Tabla 29: Determinación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en manos de operarios del comedor universitario - Año 2016

Determinación	Lugar de Muestreo	Antes de Limpieza y Sanitización
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocinero 1 sin guantes	S/D
	Expendedor 1 con guantes	S/D
	Cocinero 2 sin guantes	Presencia
	Expendedor 2 de pan y fruta con guantes	S/D
	Repositor de verdura para ensaladas	Presencia

S/D= Sin Desarrollo

Tabla 30: Determinación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en manos de operarios del comedor universitario - Año 2017

Determinación	Lugar de Muestreo	Antes de Limpieza y Sanitización
<i>Staphylococcus aureus</i>	Operario de cocina sin guantes	S/D
	Expendedor de pan y fruta sin guante	S/D
	Expendedor de menú con guante	Presencia
	Operario de cocina sin guante	S/D
	Operario de cocina sin guante	Presencia

S/D= Sin Desarrollo

En los dos años de muestreo se detectó la presencia de *S. aureus* en 2 de las 5 muestras (40%) de manos de manipuladores. Estos valores superan a los obtenidos por Valero y col. (2017) (26,6%), Castro y col. (2016) (11%), Shojaei y col. (2006) (12,6%) y Djekic y col. (2016) (5,3%), pero son inferiores a los reportados por Lues y Van Tonder (2007) (88%) y Aycicek y col. (2004a) (70%).

En el presente estudio no se observaron diferencias entre los operarios que utilizaban y no utilizaban guantes, lo cual indicaría que el uso de guantes podría evitarse si se realiza un correcto lavado de manos cada vez que sea necesario.

El Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM), expuso sobre el uso de guantes de látex y los peligros inherentes. La utilización del látex puede dar lugar a problemas de contaminación cruzada (guantes rotos) y puede causar reacciones anafilácticas en personas sensibles al mismo (por transferencia de proteínas de látex a

los alimentos). Por todo esto, se indicó que no se usen guantes de látex para la manipulación de alimentos, reforzando para ello el lavado frecuente de manos, o bien que estos se reemplacen por guantes de nitrilo y/o vinilo (IRAM, 2014). Rodríguez y col. (2011) describen en su estudio la misma discusión. Además, según Lues y Van Tonder (2007), los guantes tienen la desventaja adicional de que si los individuos no se lavan las manos antes de ponerse los guantes, tanto el interior como el exterior de los mismos se contamina y que el lavado es, a menudo, descuidado u omitido cuando se usan los guantes permitiendo a los microorganismos presentes en las manos multiplicarse rápidamente dentro del ambiente húmedo y cálido que se genera.

5.3.3 Análisis microbiológico del ambiente del comedor de la UNRC

En las tablas 31 y 32 se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis de la carga fúngica en el ambiente de la cocina del comedor universitario antes y después de la higiene del ambiente en los dos años de muestreo.

Tabla 31: Determinación de la carga fúngica del ambiente del comedor universitario - Año 2016

Determinación	Lugar de muestreo	Antes de Limpieza y Sanitización	Después de Limpieza y Sanitización
		Resultado (colonias)	
Hongos y levaduras	Mesada lado este debajo de ventana (15 min)	24	19
	Mesada lado este debajo de ventana (30 min)	36	25
	Mesada 2 (15 min)	38	22
	Mesada 2 (30 min)	80	35
	Mesada anafe central (15 min)	31	13
	Mesada anafe central (30 min)	44	24
	Mesada 4 (15 min)	24	25
	Mesada 4 (30 min)	49	26
	Mesada lado noreste debajo de ventana (15 min)	25	14
	Mesada lado noreste debajo de ventana (30 min)	44	21

Tabla 32: Determinación de la carga fúngica del ambiente del comedor universitario - Año 2017

Determinación	Lugar de muestreo	Antes de Limpieza y Sanitización	Después de Limpieza y Sanitización
		Resultado (colonias)	
Hongos y levaduras	Mesada lado este debajo de ventana (15 min)	52	46
	Mesada lado este debajo de ventana (30 min)	70	66
	Mesada 2 (15 min)	32	18
	Mesada 2 (30 min)	50	41

5. Resultados y discusión

	Mesada anafe central (15 min)	41	23
	Mesada anafe central (30 min)	80	28
	Mesada 4 (15 min)	60	16
	Mesada 4 (30 min)	94	27
	Mesada lado noreste debajo de ventana (15 min)	46	28
	Mesada lado noreste debajo de ventana (30 min)	75	45

En las figuras 8, 9, 10, 11 y 12 puede observarse la carga de hongos y levaduras en el ambiente de la cocina del comedor universitario, antes y después de la limpieza y sanitización en diferentes ubicaciones y tiempos de exposición.

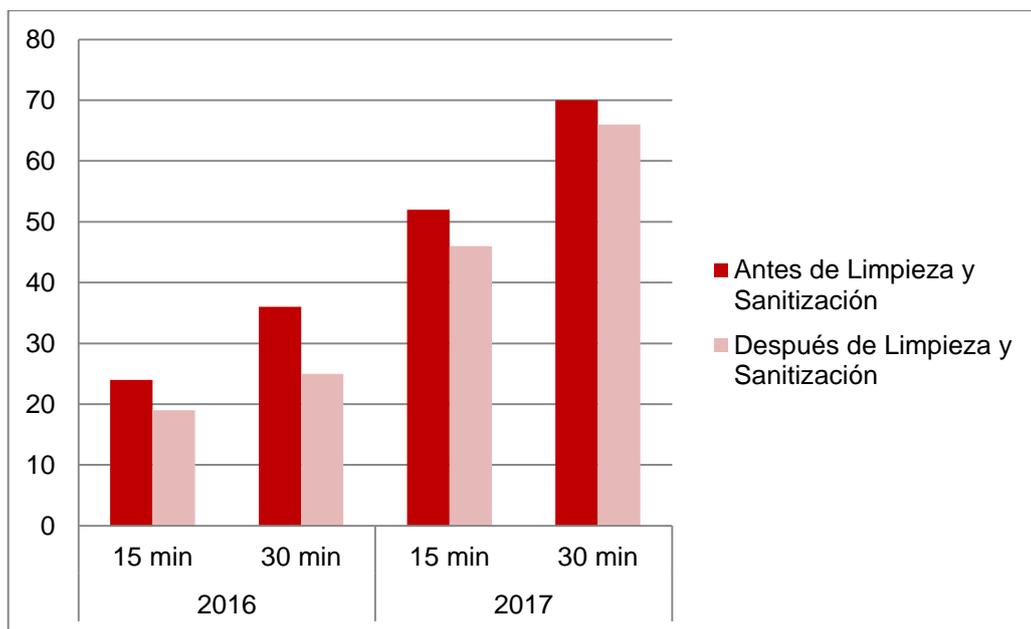


Figura 8: Número de colonias fúngicas en la mesada lado este (debajo de ventana)

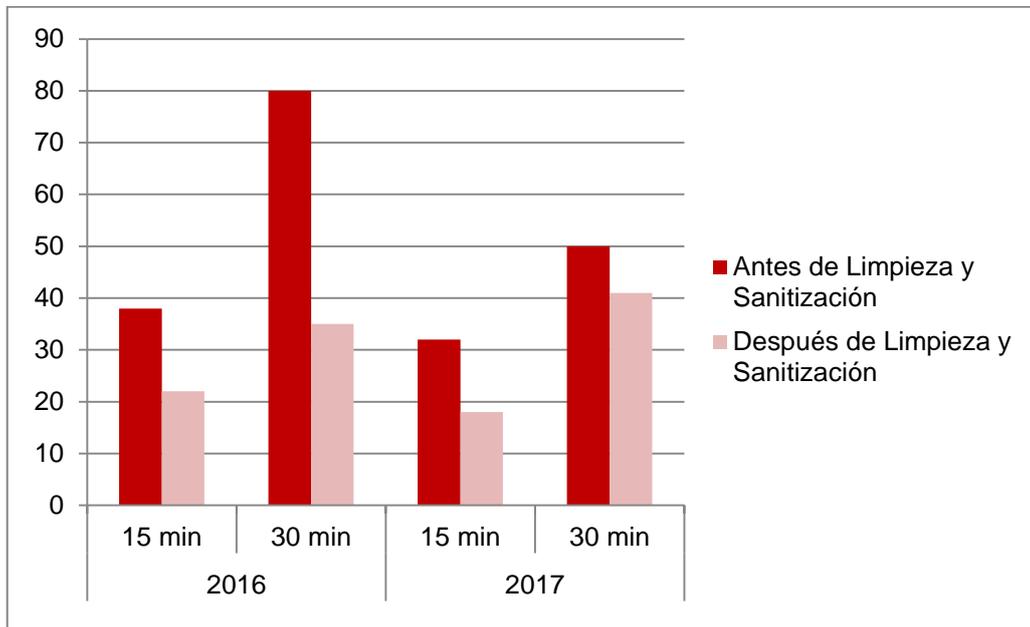


Figura 9: Número de colonias fúngicas en la mesada 2

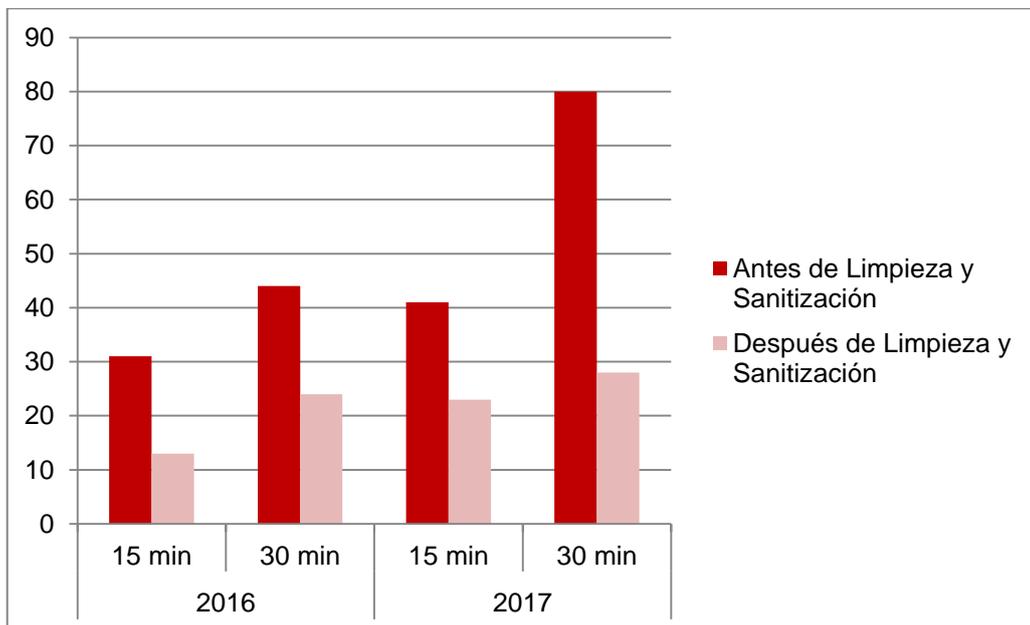


Figura 10: Número de colonias fúngicas en la mesada anafe central

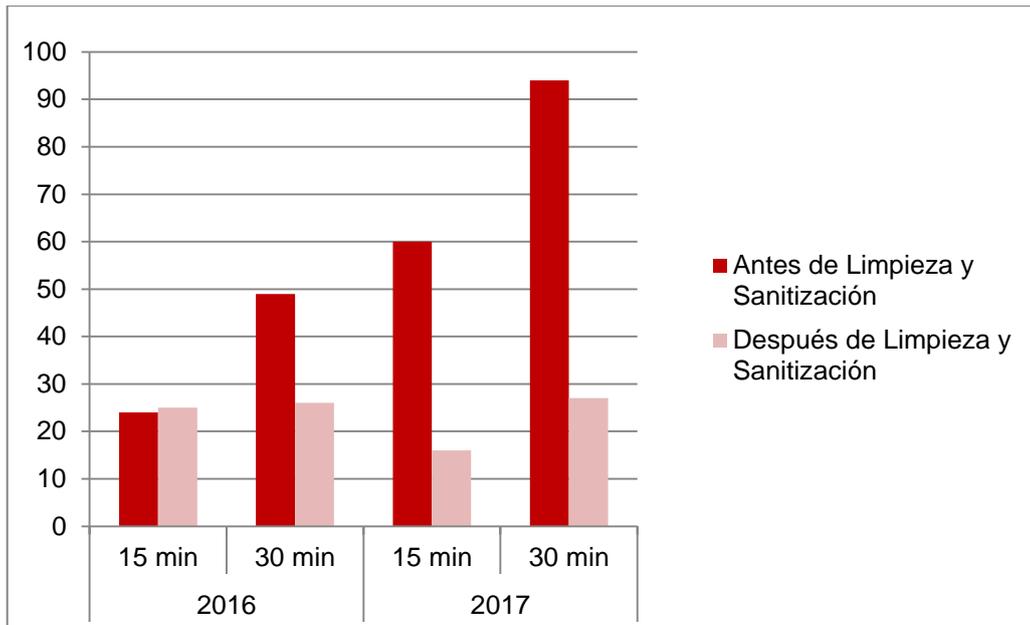


Figura 11: Número de colonias fúngicas en la mesada 4

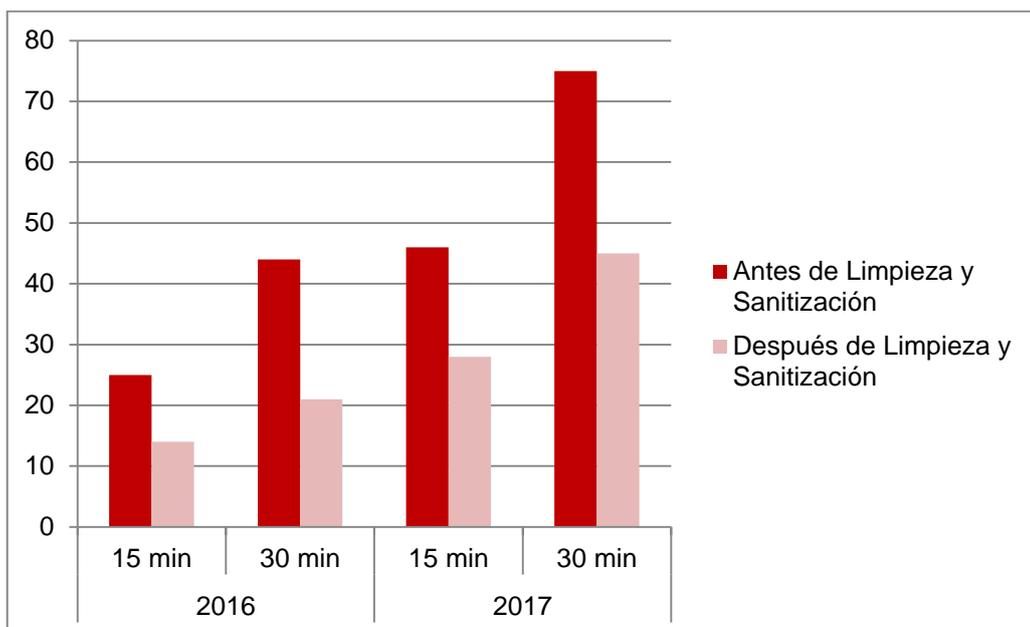


Figura 12: Número de colonias fúngicas en la mesada lado noreste (debajo de ventana)

En el año 2016 se puede observar que la carga fúngica después de la limpieza y sanitización se redujo aproximadamente entre un 30 y 60% en cada superficie muestreada. En cuanto al año 2017 la carga fúngica, después de la limpieza y sanitización, se redujo aproximadamente entre un 40 y 75% en cada superficie muestreada, a excepción de la mesada lado este (debajo de ventana, a los 15 y 30 min) y mesada 2 (a los 30 min).

La carga fúngica presente en ambientes elaboradores de alimentos determina el nivel de contaminación del mismo. Según un estudio realizado en cocinas industriales, una contaminación ambiental alta está determinada por un desarrollo en placa de Petri (de 55 mm de diámetro) durante 15 minutos de más de 10 colonias de hongos; una contaminación media por un desarrollo de 2 a 10 colonias de hongos y una contaminación baja por un desarrollo de menos de 2 colonias (Fumispore, 2011). Si se comparan los resultados obtenidos en este estudio con los valores descritos por Fumispore, en general la contaminación del ambiente del comedor universitario antes y después de la limpieza y sanitización es alta.

Actualmente no se cuenta con demasiada información ya que la mayoría de los trabajos publicados, realizan los muestreos por toma de muestra activa (muestreadores de aire).

Comparando los resultados obtenidos en ambos muestreos ambientales de la cocina del comedor, se observa claramente que la carga fúngica en el año 2017 fue mucho mayor. Cabe destacar que el muestreo del 2016 se realizó en primavera y el del 2017 en invierno, con lo cual se esperaría que en épocas de bajas temperaturas los valores de hongos disminuyeran. Los resultados obtenidos no fueron coincidentes con lo expuesto anteriormente, lo que pudo deberse a la falta de sistemas de ventilación de circuito cerrado en el edificio, ya que estos inciden directamente en la dispersión o deposición de esporas, además modifican la humedad relativa como así también la temperatura superficial. La sala de producción de alimentos en el comedor universitario sólo esta provista de un extractor de aire amudado a una de las paredes y ventanas (en su mayoría orientadas al lado norte). Durante el muestreo realizado en el año 2016 las ventanas permanecieron abiertas, lo cual por un lado favorecía la entrada de aire exterior que contiene bioaerosoles pero también permitía el recambio de aire; en el muestreo del año 2017 las ventanas permanecieron cerradas y, conjuntamente con el calor proveniente de los hornos y hornallas, provocaron que se genere condensación en ventanas y paredes, aumentando la humedad relativa de ambiente que es la condición más importante ya que cuando los materiales son saturados o mojados existe una gran oportunidad para la germinación y crecimiento de hongos. Otro factor importante que incide en la carga fúngica es la localización geográfica, este es un punto importante ya que el campus universitario se encuentra sobre la Ruta Nacional 36 y en su mayoría está rodeada por campos de cultivo.

5. Resultados y discusión

Incluso en ambientes que no han sido inundados las esporas de los hongos pueden germinar y crecer cuando la humedad alcanza el 75%. En condiciones mínimas para su desarrollo puede necesitar de ambientes con humedad relativa mayor al 60%.

Las conclusiones obtenidas en este estudio son las siguientes:

- De un total de 67 alimentos analizados, que incluyen los elaborados en el comedor universitario y en las ocho empresas externas, 52 (78%) presentaron una calidad microbiológica aceptable al cumplir con la normativa nacional vigente (Código Alimentario Argentino).
- Los resultados obtenidos en este estudio revelan que la seguridad microbiológica de todos los alimentos listos para el consumo examinados fue satisfactoria en cuanto a la ausencia de *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*.
- De las 22 muestras de alimentos elaboradas en el comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto se determinó que todas fueron aptas para el consumo humano, cumpliendo los requisitos microbiológicos establecidos.
- De un total de 45 muestras analizadas de alimentos elaborados en ocho empresas de la ciudad de Río Cuarto y tomadas a partir del comedor universitario, 15 (33,3%) no fueron consideradas aptas para el consumo humano por no cumplir con la norma vigente al superar los límites de recuento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y enterobacterias.
- De las 6 muestras de materias primas analizadas, el 33,3% (2 muestras) fue considerado no apto para el consumo humano.
- En todas las muestras de superficie analizadas en el sector cocina del comedor universitario, los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos viables totales, de enterobacterias, de coliformes totales y de hongos y levaduras disminuyeron luego de la limpieza y sanitización, demostrando la efectividad de los métodos de higiene.
- El 100% de las muestras de manos de operarios mostraron recuentos de microorganismos indicadores tales como aerobios mesófilos viables totales, coliformes totales y/o enterobacterias, mientras que el 40% demostró la presencia de *Staphylococcus aureus*, lo cual evidencia una falla en el uso de guantes y/o en el proceso de lavado de manos.
- El presente estudio podría ser utilizado como guía para evaluar la eficacia de la higiene y, cuando sea necesario, mejorar el programa de saneamiento de la cocina del comedor de la Universidad Nacional de Río Cuarto debido a que la legislación argentina carece de límites microbiológicos para superficies vivas e inertes en contacto con alimentos.

6.1 Recomendaciones

- Proporcionar capacitaciones periódicas de Buenas Prácticas de Manufactura a los manipuladores de alimentos y evaluar los conocimientos adquiridos en dichas capacitaciones.
- El presente estudio propone que, para minimizar los niveles microbianos en los alimentos listos para el consumo, son necesarios programas regulares de examen de la calidad microbiológica de los mismos como así también el control de las actitudes/aptitudes de los manipuladores de alimentos.
- Reemplazar los instrumentos de cocina deteriorados (tablas de corte, bandejas de lavado de verduras, etc.).

7.1 Medios de cultivo

❖ Agar Baird-Parker (medio base)

Peptona de caseína.....	10 g
Extracto de carne.....	5 g
Extracto de levadura.....	1 g
Glicina.....	12 g
Piruvato de sodio.....	10 g
Cloruro de Litio.....	5 g
Agar.....	20 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 7,0 +/- 0,2

Cada 100 ml de medio base fundido y templado a 45° C añadir:

- Solución de telurito de potasio 1% P/V: 1 ml.
- Emulsión de yema de huevo: 5 ml.

❖ Agar Bismuto Sulfito (Wilson-Blair modificado)

Triptona.....	5 g
Digesto péptico de carne.....	5 g
Extracto de carne.....	5 g
Glucosa.....	5 g
Fosfato disódico.....	4 g
Sulfato ferroso.....	0,3 g
Citrato de bismuto amoniacal.....	1,85 g
Sulfito de sodio.....	6,15 g
Verde brillante.....	0,025 g
Agar.....	14,7 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 7,6 +/- 0,2

❖ Agar Citrato de Simmons

Citrato de sodio.....	2 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Fosfato dipotásico.....	1 g
Fosfato monoamónico.....	1 g
Sulfato de magnesio.....	0,2 g
Azul de bromotimol.....	0,08 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 6.9 +/- 0,2

❖ Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)

Peptona.....	10 g
Lactosa.....	10 g
Fosfato dipotásico.....	2 g
Eosina.....	0,4 g
Azul de metileno.....	0,065 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 7,1 +/- 0,2

❖ Agar Fenil Alanina (FA)

DL-Fenilalanina.....	2 g
Extracto de levadura.....	3 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Fosfato disódico.....	1 g
Agar.....	12 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 7,3 +/- 0,2 a 25°C

❖ Agar Hierro Triple Azúcar (TSI)

Extracto de carne.....	3 g
Pluripeptona.....	20 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Lactosa.....	10 g
Sacarosa.....	10 g
Glucosa.....	1 g
Sulfato de hierro y amonio.....	0,2 g
Tiosulfato de sodio.....	0,2 g
Rojo de fenol.....	0,025 g
Agar.....	13 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 7,3 +/- 0,2 a 25°C

❖ Agar Hongos y Levaduras

Extracto de levadura.....	5 g
Glucosa.....	20 g
Cloranfenicol.....	0,1 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 6,6 +/- 0,2 a 25°C

❖ Agar Lisina Hierro (LIA)

Peptona de gelatina.....	5 g
Extracto de levadura.....	3 g
Glucosa.....	1 g
L-lisina.....	10 g
Citrato de hierro y amonio.....	0,5 g
Tiosulfato de sodio.....	0,04 g
Púrpura de bromocresol.....	0,02 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 6,7 +/- 0,2 a 25°C

❖ Agar Nutritivo (AN)

Pluripeptona.....	5 g
Extracto de carne.....	3 g
Cloruro de sodio.....	8 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 7,3 +/- 0,2

❖ Agar Plate Count

Hidrolizado enzimático de caseína.....	5 g
Extracto de levadura.....	2,5 g
Dextrosa.....	1 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 7 +/- 0,2

❖ Agar Salmonella y Shigella (Agar S-S)

Digesto pancreático de carne.....	5 g
Extracto de carne.....	5 g
Lactosa.....	10 g
Sales biliares.....	8,5 g
Citrato de Sodio.....	10 g
Tiosulfato de Sodio.....	8,5 g
Citrato de amonio férrico.....	1 g
Verde brillante.....	0,00033 g
Rojo neutro.....	0,025 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 7.0 +/- 0,2

❖ Agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina (SPS)

Peptona de caseína.....	15 g
Extracto de levadura.....	10 g
Citrato de hierro (III).....	0,5 g
Sulfito sódico.....	0,5 g
Sulfato de Polimixina B.....	0,01 g
Sulfadiazina sódica.....	0,12 g
Agar-Agar.....	13,9 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 7,0 +/- 0,2 a 25°C

❖ Agar Violeta-Rojo neutro-Bilis-Glucosa (VRBG)

Peptona de gelatina.....	7 g
Extracto de levadura.....	3 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Glucosa.....	10 g
Mezcla de sales biliares.....	1,5 g
Rojo neutro.....	0,03 g
Cristal violeta.....	0,002 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 7,4 +/- 0,2

❖ Agar Violeta-Rojo neutro-Bilis- Lactosa (VRBL)

Extracto de levadura.....	3 g
Peptona.....	7 g
Sales biliares.....	1,5 g
Lactosa.....	10 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Rojo neutro.....	0,03 g
Cristal violeta.....	0,002 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 7,4 +/- 0,2

❖ Agua de peptona bufferada

Peptona de carne	10 g
Cloruro de sodio.....	5 g
Fosfato disódico	3,5 g
Fosfato monopotásico	1,5 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 7,2 +/- 2

❖ Agua de Peptona para diluciones

Peptona	1 g
Agua destilada.....	1000 ml

La peptona de carne es un hidrolizado péptico de carne bovina.

pH: 7-7,2

❖ Agua de peptona para indol

Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 7,1 - 7,3

❖ *Bacillus cereus* Selectivo Agar (según Mossel)

Peptona de carne	10 g
Extracto de carne	1 g
Manitol	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Rojo fenol	0,025 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 7,2 +/- 0,2 a 25°C

❖ B.A.M. con urea medio

Peptona	20 g
Lactosa	3 g
Urea	10 g
Fucsina ácida	0,037 g
Azul de timol	0,048 g
Agar	3 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 8,3 +/- 0,2 a 25°C

❖ Caldo Cerebro Corazón (CCC)

Infusión de cerebro	200 g
Infusión de corazón	250 g
Peptona.....	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Glucosa	2 g
Fosfato disódico	2,5 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 7,4 +/- 0,2

❖ Caldo Giolitti Cantoni

Tripteína	10 g
Extracto de carne	5 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de litio	5 g
Manitol	20 g
Cloruro de sodio	5 g
Glicina.....	1,2 g
Piruvato de sodio	3 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 6,9 +/- 0,2 a 25°C

❖ Caldo Mac Conkey

Peptona de gelatina	20 g
Bilis de buey	5 g
Lactosa	10 g
Púrpura de Bromocresol	0,01 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 7,3 +/- 0,2 a 25°C

❖ Caldo Rappaport Vassiliadis

Triptona	4,5 g
Cloruro de sodio	7,2 g
Fosfato monopotásico	1,44 g
Cloruro de magnesio (anhidro).....	13,3 g
Oxalato de verde de malaquita	0,036 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 5,2 +/- 0,2 a 25°C

❖ Caldo Tetrionato Base (CT)

Peptona	5 g
Sales biliares	1 g
Carbonato de calcio	10 g
Tiosulfato de sodio	30 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 8,4 +/- 0,2 a 25 °C

Por cada 10 ml de medio base añadir 0,2 ml de solución iodo iodurada.

❖ Medio de Clark y Lubs (RM-VP)

Peptona	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico	5 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 6,7- 7,1

❖ Sangre agar base

Infusión de músculo de corazón	375 g
Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 7.3 +/- 0,2

Agregar 5-10% de sangre ovina desfibrinada estéril al medio esterilizado, fundido y enfriado a 45-50°C

❖ Caldo tioglicolato

Tripteína de soya	17 g
Peptona de soya	3 g
Glucosa	6 g
Cloruro de sodio	2,5 g
Tioglicolato de sodio	0,5 g
L-cistina	0,25 g
Sulfito de sodio	0,1 g
Agar	0,7 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 7 +/- 0,2

❖ Agar yema de huevo

Tripticasa	40 g
Fosfato disódico	5 g
Cloruro sódico	2 g
Sulfato de magnesio al 0,5% p/v	0,2 ml
Glucosa	2 g
Agar	25 g
Agua destilada.....	1000 ml

pH: 7,3-7,4

Añadir emulsión de yema de huevo al medio de cultivo estéril y fundido a 45-50°C.

❖ Medio base de Hugh y Leifson

Tripteína	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato dipotásico	0,3 g
Azul de bromotimol	0,03 g
Agar	2,5 g
Agua destilada	1000 ml

Añadir solución de glucosa, lactosa o sacarosa al 10%.

pH: 7,1 +/- 0,2 a 25°C

❖ Agar gelatina

Gelatina.....	120 g
Caldo nutritivo.....	1000 ml

7.2 Adicionales de medios de cultivo, soluciones y otros materiales

❖ Solución iodo iodurada

Ioduro de potasio.....	5 g
Iodo.....	6 g
Agua destilada.....	20 ml

❖ Solución fisiológica al 0,9%

Cloruro de sodio	0,9 g
Agua destilada.....	100 ml

❖ Emulsión Yema de Huevo

Yema de huevo	50 ml
Solución fisiológica (0,9%).....	50 ml

❖ Agar-agar

Agar.....	15 g
Agua destilada	1000 ml

❖ VAS-PAR

Parafina.....	50 g
Vaselina.....	100 ml

❖ Vaselina estéril.

❖ Discos de oxidasa.

7.3 Reactivos

❖ Reactivo para indol (Kovacs)

Paradimetil-amino-benzaldehído	5 g
Alcohol isoamílico	75 ml
Ácido clorhídrico concentrado	25 ml

❖ Reactivo para Rojo de Metilo

Rojo de metilo	0,1 g
Alcohol etílico	65 ml
Agua destilada	35 ml

❖ Reactivos para Voges Proskauer (VP)

Reactivo A:

Alfa-naftol	5 g
Alcohol etílico absoluto	100 ml

La solución debe guardarse al resguardo de la luz.

Reactivo B:

Hidróxido de Potasio	40 g
Agua destilada	100 ml

❖ Cloruro férrico

Cloruro férrico	10 g
Agua destilada.....	100 ml

- **Acosta R.S.** (2008). *Saneamiento Ambiental e Higiene de los Alimentos*. Editorial Brujas. Córdoba, Argentina. ISBN 978-987-591-123-9.
- **Alonso N. y Poveda J.** (2008). *Estudio comparativo en técnicas de recuento rápido en el mercado y placas Petrifilm 3MTM para el análisis de alimentos*. Tesis de grado. Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Orientación Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia. <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis230.pdf>
- **AMyD (Administración de Manuales y documentos de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México).** (2017). Análisis de superficies inertes. http://amyd.quimica.unam.mx/pluginfile.php/3786/mod_resource/content/2/Analisis%20de%20superficies%20inertes.pdf (última consulta: noviembre de 2017).
- **ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica).** *Guía de interpretación de resultados microbiológicos de alimentos*. http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Guia_de_interpretacion_resultados_microbiologicos.pdf (última consulta: noviembre de 2017).
- **ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, República Federativa de Brasil).** (2001). http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/%281%29RDC_12_2001_COMP.pdf/b3cb6241-6d1b-49fc-8a88-b0781a147980 (última consulta: noviembre de 2017).
- **Arias-Echandi M.L. y Antillón F.G.** (2000). *Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica. Una revisión de 10 años*. Revista Biomed 11: 113-122. <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb001125.pdf>
- **Aycicek H., Aydogan H., Kucukkaraaslan A., Baysallar M. y Basustaoglu A.C.** (2004a). *Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers*. Food Control 15: 253-259.
- **Aycicek H., Sarimehmetoglu B. y Cakiroglu S.** (2004b). *Assessment of the microbiological quality of meals sampled at the meal serving units of a military hospital in Ankara, Turkey*. Food Control 15: 379-384.
- **Balzaretti C.M. y Marzano M.A.** (2013). *Prevention of travel-related foodborne diseases: Microbiological risk assessment of food handlers and ready-to-eat foods in northern Italy airport restaurants*. Food Control 29: 202-207.
- **BOE (Boletín Oficial del Estado).** (2011). Ley 17/2011, de seguridad alimentaria y nutrición. <https://www.boe.es/buscar/pdf/2011/BOE-A-2011-11604-consolidado.pdf> http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subseccion/soporte_juridico.htm (última consulta: abril de 2018).

- **Bridier A., Sanchez-Vizueté P., Guilbaud M., Piard J.C., Naïtali M., Briandet R.** (2015). *Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens*. Food Microbiology 45: 167-178.
- **Britania.** (2017). *Volumen II. Monitoreo de la higiene de superficies*. <http://www.laensenadacorp.com/documentos/Apuntell-MONITOREODEHIGIENE.pdf> (última consulta: noviembre de 2017).
- **CAAa (Código Alimentario Argentino)** (2010). *Capítulo I. Disposiciones Generales*. Actualizado al 9/2010 (última consulta: abril de 2018).
- **CAAb (Código Alimentario Argentino)** (2010). *Capítulo II: Condiciones generales de las fábricas y comercios de alimentos*. Actualizado al 10/2010 (última consulta: noviembre de 2017).
- **CAA (Código Alimentario Argentino)** (2017). *Capítulo III: De los productos alimenticios*. Actualizado al 10/2017 (última consulta: noviembre de 2017).
- **CAE (Código Alimentario Español)** (2000). Normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de comidas preparadas. Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado (BOE). <http://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2001-809> (última consulta: noviembre 2017).
- **Cantarutti, I.** (2015). *Evaluación microbiológica de las comidas y del ambiente del comedor universitario de la Universidad Nacional de Río Cuarto*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos. Río Cuarto, Argentina.
- **Castro A., Santos C., Meireles H., Silva J. y Teixeira P.** (2016). *Food handlers as potential sources of dissemination of virulent strains of Staphylococcus aureus in the community*. Journal of Infection and Public Health 9: 153-160.
- **CE (Comunidad Europea).** (2004). Reglamento (CE) N° 852/2004. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:es:PDF> (última consulta: julio de 2017)
- **Christison C.A., Lindsay D. y von Holy A.** (2008). *Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa*. Food Control 19: 727-733.
- **CM (Comunidad de Madrid)** (2011). *Directrices para el diseño, implantación y mantenimiento de un sistema APPCC y unas prácticas correctas de higiene en el sector*

de comidas preparadas. Documentos Técnicos de Higiene y Seguridad Alimentaria N° 3.

http://www.madrid.org/cs/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=Content-disposition&blobheadername2=cadena&blobheadervalue1=filename%3DDirectrices_APPCC_ECP_DTHSA_3.pdf&blobheadervalue2=language%3Des%26site%3DPortalSalud&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1271944583840&ssbinary=true (última consulta: noviembre 2017).

- **Codex Alimentarius (Adoptada en 1995; última revisión: 2009; última enmienda: 2017).** http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCODEX%2BSTAN%2B193-1995%252FCXS_193s.pdf (última consulta: noviembre 2017).
- **Coria, G.** (2005). *Control microbiológico de platos preparados y del ambiente de elaboración en el comedor de la UNRC*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos. Río Cuarto, Argentina.
- **Dancer S.J.** (2004). *How do we assess hospital cleaning? A proposal for microbiological standards for surface hygiene in hospitals*. *Journal of Hospital Infection* 56: 10-15.
- **DIGESA (Dirección General de Salud Ambiental).** (2017). *Proyecto: Guía Técnica de Criterios y Procedimientos para el Examen Microbiológico de Superficies en relación con Alimentos y Bebidas*. http://www.digesa.minsa.gob.pe/norma_consulta/proy_microbiologia.htm (última consulta: noviembre de 2017).
- **Djekic I., Kuzmanovic J., Andelkovic A., Saracevic M., Stojanovic M. y Tomasevic I.** (2016). *Effects of HACCP on process hygiene in different types of Serbian food establishments*. *Food Control* 60: 131-137.
- **Fang T.J., Wei Q.K., Liao C.W., Hung M.J. y Wang T.H.** (2003). *Microbiological quality of 18 °C ready-to-eat food products sold in Taiwan*. *International Journal of Food Microbiology* 80: 241-250.
- **FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).** (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico*. ISBN 978-92-5-306153-2.

- **FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).** (2011). *Una introducción a los conceptos básicos de la seguridad alimentaria* <http://www.fao.org/docrep/014/al936s/al936s00.pdf> (última consulta: agosto de 2017).
- **FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).** (2017). Glosario de términos. <http://www.fao.org/docrep/014/am401s/am401s07.pdf> (última consulta: noviembre de 2017).
- **FAO, ALADI y CEPAL (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Asociación Latinoamericana de Integración y Comisión Económica para América Latina y el Caribe).** (2017). *Plataforma de Seguridad Alimentaria y Nutricional: Argentina*. <http://plataformacelac.org/pais/arg> (última consulta: abril de 2018).
- **FAO y OPS (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y Organización Panamericana de la Salud).** (2017). *América Latina y el Caribe. Panorama de la Seguridad Alimentaria y Nutricional. Sistemas alimentarios sostenibles para poner fin al hambre y la malnutrición 2016*. ISBN 978-92-5-309608-4.
- **FAO, OPS y OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud).** (2016). *Manual para manipuladores de alimentos: Instructor*. Publicado en Washington, D.C. ISBN: 978-92-75-31902-4.
- **FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos).** (2017) <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/FSMA/default.htm> (última consulta: noviembre de 2017).
- **Feldman P., Melero M., Teisaire C., Nonzioli A., Santín C, Alderete J.M., Clause J., Ferrario R., Gulielmetti B. y Novas G.** (2016). *Sistemas de gestión de calidad en el sector agroalimentario: BPM-POES-MIP-HACCP*. Ministerio de Agroindustria, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/publicaciones/calidad/BPM/Gestion_Calidad_Agroalimentario_2016.pdf (última consulta: septiembre de 2017).
- **Fernández R.A. y Ciccarelli A.S.** (1996). Actualización *Clostridium botulinum* en *MICROBIOLOGÍA BIOMÉDICA. Bacteriología, Microbiología, Virología, Parasitología, Inmunología*. Basualdo, Coto, de Torres. 1a. Ed. 1996. <https://botulismo-argentina.wikispaces.com/file/view/Cbotulinum.pdf>

- **Fijałkowski K., Peitler D. y Karakulska J.** (2016). *Staphylococci isolated from ready-to-eat meat – Identification, antibiotic resistance and toxin gene profile*. International Journal of Food Microbiology 238: 113-120.
- **Forsythe S.J. y Hayes P.R.** (2007). *Higiene de los Alimentos, Microbiología y HACCP*. (Segunda ed.). Ed.Acribia S.A. Zaragoza, España. ISBN 978-84-200-0986-5.
- **Fumispore.** (2011). *Contaminación fúngica del aire. Información técnica para el usuario, parte 3*. Elaborado por Empresa Norpacific. <https://es.scribd.com/document/330471927/evaluacion-del-aire> (última consulta: agosto de 2017).
- **Gnesutta, B.** (2010). *Evaluación microbiológica de las comidas y del ambiente del comedor universitario de la UNRC*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos. Río Cuarto, Argentina.
- **Guerrero J.A., Folleco Villarreal A.E., Acosta Amador N.M. y Monataño L.A.** (2016). *Protocolo de vigilancia en Salud Pública. Enfermedades Transmitidas por Alimentos*. Instituto Nacional de Salud. República de Colombia.
- **Imperiale R., Rudà E., Bianchi D.M., Gallina S., Gilli G. y Decastelli I.** (2017). *Microbiological quality of sandwiches from local cafés and food vending machines in Turin, Italy*. EC Microbiology 5.6: 209-214.
- **INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial).** (2016). *Guía para la formación de manipuladores de alimentos*. ISBN: 978-950-532-312-8.
- **IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación).** (2014). *1º Jornadas de Normalización en Alimentos y Salud del IRAM*.
- **Jay J.M., Loessner M.J. y Golden, D.A.** (2005). *Microbiología Moderna de los Alimentos*. (Quinta. ed.). Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. ISBN 978-84-200-1125-7.
- **Kluytmans J., van Leeuwen W., Goessens W., Hollis R., Messer S., Herwaldt L., Bruining H., Heck M., Rost J. y van Leeuwen N.** (1995). *Food-initiated outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus analyzed by pheno-and genotyping*. Journal of Clinical Microbiology 33(5): 1121-1128.
- **Kotzekidou P.** (2013). *Microbiological examination of ready-to-eat foods and ready-to-bake frozen pastries from university canteens*. Food Microbiology 34(2): 337-343.

- **Lerda, B.** (2010). *Evaluación microbiológica de las comidas y del ambiente del comedor universitario de la UNRC*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos. Río Cuarto, Argentina
- **Losito P., Visciano P., Genuardo M., Satalino R., Migailo M., Ostuni A., Luisi A. y Cardone G.** (2017). *Evaluation of hygienic conditions of food contact surfaces in retail outlets: Six years of monitoring*. *LWT - Food Science and Technology*, 77: 67-71.
- **Lues J.F.R. y Van Tonder I.** (2007). *The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group*. *Food Control* 18(4): 326-332.
- **Marriot N.G.** (2003). *Principios de higiene alimentaria* (Cuarta ed.). Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. I.S.B.N.: 84-200-1012-X.
- **Martí, L.E., Sequeira, G., Rosmini, M., Repetto, H., Frizzo, L. y Signorini, M.** (2012). *Food Safety. La seguridad alimentaria como política pública*. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). <http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/otras%20pub/SeguridadAlimentaria.pdf> (última consulta: agosto de 2017).
- **Mataragas M., Zwietering M.H., Skandamis P.N. y Drosinos E.H.** (2010). *Quantitative microbiological risk assessment as a tool to obtain useful information for risk managers - Specific application to Listeria monocytogenes and ready-to-eat meat products*. *International Journal of Food Microbiology* 141: S170-S179.
- **Mercado, C.E.** (2007). *Los ámbitos normativos, la gestión de la calidad y la inocuidad alimentaria: una visión integral*. *Agroalimentaria* 24: 119-131. ISSN 1316-0354.
- **FCEN (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).** (2013). *Microbiología de alimentos, Módulo 2*. Departamento de Química Orgánica, Universidad Nacional de Buenos Aires).
- **MINSA (Ministerio de salud).** (2018). *Boletín integrado de vigilancia*. <https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv-n400-se08.pdf>
- **Modzelewska-Kapitula M. & Maj-Sobotka K.** (2014). *The microbial safety of ready-to-eat raw and cooked sausages in Poland: Listeria monocytogenes and Salmonella spp. occurrence*. *Food Control* 36 (2014) 212-216.
- **Motarjemi Y. y Adams M.** (2006). *Emerging foodborne pathogens*. ISBN-13: 978-1-84569-139-4 (e-book).

- **OMS (Organización Mundial de la Salud).** (2015). *Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria.* Centro de Prensa. Comunicados de prensa. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/es/> (última consulta: octubre de 2017).
- **OMS (Organización Mundial de la Salud).** (2017a). *Inocuidad de alimentos.* <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety> (última consulta: septiembre 2017).
- **OMS (Organización Mundial de la Salud).** (2017b). *Botulismo.* Centro de Prensa de la Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs270/es/> (última consulta: octubre de 2017).
- **OPS (Organización Panamericana de la Salud).** (2017). <http://new.paho.org/arg/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroETAs/modulo2/modulo2n.html> (última consulta: octubre de 2017).
- **OPS y OMS (Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud).** (2015). *Alimentos y bebidas ultraprocesados en América Latina: tendencias, efecto sobre la obesidad e implicaciones para las políticas públicas.* ISBN 978-92-75-31864-5.
- **Osimani A., Garofalo C., Clementi F., Tavoletti S., Aquilanti L.** (2014). *Bioluminescence ATP Monitoring for the Routine Assessment of Food Contact Surface Cleanliness in a University Canteen.* Int. J. Environ. Res. Public Health 11: 10824-10837.
- **Otonello A.** (2017). *Evaluación microbiológica de las comidas y del ambiente del comedor universitario de la UNRC.* Tesis de grado. Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos. Río Cuarto, Argentina.
- **Öz V., Karadayi S., Çakan H., Karadayi B. y Çevik F.E.** (2014). *Assessment of microbiological quality of ready-to-eat foods in Istanbul, Turkey.* Journal of Food Agriculture and Environment 12(3&4): 56-60.
- **Pascual Anderson M. del R., Calderón V. y Pascual** (2000). *Microbiología alimentaria.* Segunda edición. Editorial Díaz de Santos. España. ISBN: 9788479784249.

- **Pasetti, M.A.** (2009). *Evaluación microbiológica de las comidas y del ambiente del comedor universitario de la UNRC*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos. Río Cuarto, Argentina.
- **Pasquarella C., Pitzurra O. y Savino A.** (2000). *The index of microbial air contamination*. Journal of Hospital Infection 46: 241-256.
- **RENALOA (Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos)**. (2011). *Análisis microbiológico de los alimentos. Metodología analítica oficial. Microorganismos patógenos. Volumen 1*. http://www.anmat.gov.ar/renaloe/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf (última consulta septiembre de 2017).
- **RENALOA (Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos)**. (2013). *Análisis microbiológico de los alimentos. Metodología analítica oficial. Microorganismos patógenos. Volumen 2*. http://www.anmat.gov.ar/renaloe/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_II.pdf (última consulta septiembre de 2017).
- **RENAPRA y ANMAT (Red Nacional de Protección de Alimentos y Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica)**. (2017). *Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Ficha Técnica Nº 3: Botulismo del Lactante*. http://www.anmat.gov.ar/webanmat/Publicaciones/Botulismo_lactante.pdf (última consulta: noviembre de 2017).
- **Rey, A.M. y Silvestre, A.A.** (2005). *Comer sin Riesgos 2. Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos*. (Segunda ed.). Editorial Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina. ISBN 950-504-577-8.
- **Rodríguez M., Valero A., Carrasco E., Pérez-Rodríguez F., Posada G.D. y Zurera G.** (2011). *Hygienic conditions and microbiological status of chilled Ready-To-Eat products served in Southern Spanish hospitals*. Food Control 22: 874-882.
- **SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria)**. (2014). *Guía De Aplicación del Sistema de APPCC (HACCP)*. <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2014/12/HACCP.pdf> (última consulta: noviembre de 2017).
- **Sharma I. y Mazumdar J.A.** (2014). *Assessment of bacteriological quality of ready to eat food vended in streets of Silchar city, Assam, India*. Indian Journal of Medical Microbiology 32(2): 169-171.

- **Shojaei H., Shooshtaripoor J. y Amiri M.** (2006). *Efficacy of simple hand-washing in reduction of microbial hand contamination of Iranian food handlers*. Food Research International 39(5): 525–529.
- **Solis Cajas E.R.** (2011). *Estudio micológico del aire en áreas ocupacionales y exteriores del laboratorio de investigación en productos naturales ubicado en el edificio T-10 en la ciudad universitaria en zona 12 y el laboratorio ubicado en zona 1 del centro de información y asesoría toxicológica del departamento de toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3102.pdf (última consulta: noviembre 2017).
- **Takahashi H., Saito R., Miya S., Tanaka Y., Miyamura N., Kuda T. y Kimura B.** (2017). *Development of quantitative real-time PCR for detection and enumeration of Enterobacteriaceae*. International Journal of Food Microbiology 246: 92-97.
- **TGC (TÜRK GIDA KODEKSİ MİKROBİYOLOJİK KRİTERLER YÖNETMELİĞİ)**. 2011. <https://firatozel.files.wordpress.com/2013/02/mikrobiyolojik-kriterler-yc3b6netmelic49fi.pdf> (última consulta: febrero de 2018).
- **Universidad de Murcia.** 2017. *Microorganismos marcadores: índices e indicadores*. https://www.um.es/nutbro/docs/hica/Microorganismos_marcadores.pdf (última consulta: agosto 2017).
- **Valero A., Ortiz J.C., Fongaro G., Hernández M. y Rodríguez-Lázaro D.** (2017). *Definition of sampling procedures for collective-eating establishments based on the distribution of environmental microbiological contamination on food handlers, utensils and surfaces*. Food Control 77: 8-16.
- **Weber C., Stephan R., Druggan P., Joosten H. y Iversen C.** (2009). *Improving the enrichment procedure for Enterobacteriaceae detection*. Food Microbiology 26(6): 565-572.
- **Yachecen, L.** (2012). *Evaluación microbiológica de las comidas y del ambiente del comedor universitario de la Universidad Nacional de Río Cuarto*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Microbiología de Alimentos. Río Cuarto, Argentina.

- **Yam-Fung Ng, Sai-Lai Wong, Huan-Le Cheng, Peter Hoi-Fu Yu y Shun-Wan Chan.** (2013). *The microbiological quality of ready-to-eat food in Siu Mei and Lo Mei shops in Hong Kong.* Food Control 34 (2013) 547-553.