



Universidad de Guayaquil

**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
COORDINACIÓN DE POSGRADO**

**TRABAJO DE TITULACIÓN ESPECIAL  
PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAGISTER  
SCIENSAE EN MICROBIOLOGIA AVANZADA, MENCIÓN  
INDUSTRIAL**

**TEMA:**

*Listeria monocytogenes* EN CANALES DE VACUNO,  
CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LA EMPRESA  
EMBUTIDOS LA ITALIANA, AGOSTO SEPTIEMBRE DEL  
2015.

**AUTOR**

Dr. Claudio Sánchez Morocho

**TUTOR**

Dra. Carmen Mosquera Herrera MSc.

**AÑO:**

2017

GUAYAQUIL – ECUADOR.



Of.No.073.CPFCMUG-17

Junio 29 del 2017

**Doctor en Bioquímica y Farmacia**

**Claudio Rabi Sánchez Morocho**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA: MICROBIOLOGÍA MENCIÓN INDUSTRIA**

**Ciudad**

Por medio del presente oficio comunico a usted, que aplicando lo que consta en la Normativa vigente de **UNIDAD DE TITULACIÓN ESPECIAL** de la Dirección de Postgrado Vicerrectorado de Investigación, Gestión Social de Conocimiento y Posgrado, su **Proyecto de Titulación** ha sido aprobado con el tema:

“**LISTERIA MONOCYTOGENES EN CANALES DE VACUNO COMO MATERIA PRIMA CARNICA**”.

Ha sido modificado de la siguiente manera:

**“Listeria monocytogenes EN CANALES DE VACUNO, CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LA EMPRESA EMBUTIDOS LA ITALIANA”.**

**Tutor:** Dra. Carmen Mosquera Herrera

El cual fue Revisado y aprobado por la Coordinación de Postgrado de la Facultad el día **28 de junio del 2017**, por lo tanto, puede continuar con la ejecución del mismo de acuerdo a la normativa establecida.

Atentamente,

**Dr. Guillermo Campuzano Castro Msc.**  
**COORDINADOR**

C. archivo

Revisado y Aprobado	D. Guillermo Campuzano C.
Elaborado	Nada Genero V.



**REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**FICHA DE REGISTRO DE TESIS**

**TÍTULO Y SUBTÍTULO:**

*Listeria monocytogenes* EN CANALES DE VACUNO, CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LA EMPRESA EMBUTIDOS LA ITALIANA, AGOSTO SEPTIEMBRE DEL 2015.

**AUTOR:** Dr. Claudio Sánchez Morocho

**TUTOR:** Dra. Carmen Mosquera Herrera M.Sc.

**REVISORES:**

Blg. Elvia Aspiazu M.Sc

**INSTITUCIÓN:**

UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL

**FACULTAD:**

DE CIENCIAS MEDICAS

**FECHA DE PUBLICACIÓN:**

**No. DE PÁGS:** Cincuenta y cuatro (54)

**CARRERA:**

**TÍTULO OBTENIDO:** Doctor en Bioquímica y Farmacia

**ÁREAS TEMÁTICAS:**

MICROBIOLOGÍA, BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR, INMUNOLOGÍA

**PALABRAS CLAVE:**

*Listeria monocytogenes*, vacuno, productos cárnicos, embutidos

**RESUMEN:**

**Introducción:** La bacteria *Listeria monocytogenes*, es una bacteria gram positiva, noespurulada, aerobia anaerobia facultativa, puede ingresar a las plantas de procesamiento a través de la materia prima cárnica, y así llegar a la población vulnerable. Determinar *Listeria monocytogenes* en canales de vacuno, control microbiológico en la empresa Embutidos La Italiana, durante el periodo agosto – septiembre del año 2015. **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:** Aislar e identificar a *Listeria monocytogenes* en las muestras de carne fresca en las canales de carne de vacuno, durante la primera fase de recepción de la materia prima cárnica, mediante el método de aislamiento/enriquecimiento. Aislar e identificar la *Listeria monocytogenes* en las muestras de carne fresca en las canales de carne de vacuno, al final de la segunda fase de recepción de materia prima cárnica, mediante el método de aislamiento/enriquecimiento. Determinar la distribución de la contaminación bacteriana en las canales de vacuno, en el área de recepción de materia prima cárnica de la empresa. Diseñar el protocolo de diagnóstico para *Listeria monocytogenes*. **La metodología utilizada:** es cuantitativa descriptiva, que incluye el enriquecimiento, inmuno-precipitación, e identificación bioquímica. **Los resultados:** encontrados fueron que la bacteria *Listeria monocytogenes* tiene una presencia del 2.5% sobre los canales de vacuno, también se ha demostrado que el proceso de limpieza tiene un efecto drástico sobre la flora inicial y queda reducida en los dos números logarítmicos. El protocolo para el diagnóstico de la bacteria es el adecuado.

**No. DE REGISTRO** (en base de datos):

**No. DE CLASIFICACIÓN:**

**DIRECCIÓN URL** (tesis en la web):

**ADJUNTO PDF:**

SI

NO

**CONTACTO CON AUTOR/ES**

Dr. CLAUDIO SANCHEZ MOROCHO

**Teléfono:**  
072842218

**E-mail:**  
[Claudio\\_rsm@hotmail.com](mailto:Claudio_rsm@hotmail.com)

**CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:**

**Nombre:** COORDINACIÓN DE POSGRADO

**Teléfono:** 228 8086

**E-mail:** egraduadosug@hotmail.com

**CERTIFICACIÓN DEL TUTOR**

En mi calidad de tutor del estudiante **CLAUDIO RABI SANCHEZ MOROCHO**, del Programa de Maestría/Especialidad **MICROBIOLOGÍA AVANZADA MENCIÓN INDUSTRIAL**, nombrado por el Decano de la Facultad de **CIENCIAS MÉDICAS**, CERTIFICO: que el estudio de caso del examen complejo titulado *Listeria monocytogenes* **EN CANALES DE VACUNO, CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LA EMPRESA EMBUTIDOS LA ITALIANA, AGOSTO SEPTIEMBRE DEL 2015**, en opción al grado académico de Magíster (Especialista) en **MICROBIOLOGÍA AVANZADA MENCIÓN INDUSTRIAL**, cumple con los requisitos académicos, científicos y formales que establece el Reglamento aprobado para tal efecto.

**Atentamente**

  
**DRA. CARMEN MOSQUERA HERRERA M.Sc.**

**TUTORA**

Guayaquil, 22 de Agosto del año 2017

**DEDICATORIA**

A mis padres, hermana, mi esposa e hijos por el apoyo incondicional en todos los proyectos de mi vida.

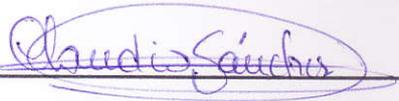
## **AGRADECIMIENTO**

A Dios sobre todas las cosas.

A la empresa EMBUTIDOS LA ITALIANA por la gran apertura que me brindaron en todos los aspectos de la vida.

## DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación especial, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL”



A handwritten signature in blue ink, reading "Claudio Sánchez", is written over a horizontal line. The signature is enclosed in a blue oval.

**FIRMA**

**Dr. CLAUDIO RABI SANCHEZ MOROCHO**

**CI 0102188000**

## INDICE

	pág.
RESUMEN.....	IX
INTRODUCCION.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	3
JUSTIFICACION.....	4
PREGUNTAS DE INVESTIGACION .....	5
OBJETIVOS.....	6
OBJETIVO GENERAL.....	6
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	6
HIPÓTESIS.....	7
1 MARCO TEÓROCO.....	8
1.1 LISTERIA MONOCYTOGENES.....	8
1.1.1 MORFOLOFIA Y ESPECIES.....	8
1.1.2 FISIOLÓGÍA Y MEDIO AMBIENTE.....	9
1.1.3 LISTERIOSIS HUMANA .....	10
1.1.4 LISTERIOSIS BOVINA.....	14
1.2 MATERIA PRIMA CARNICA.....	14
1.3 CONTROL MICROBIOLÓGICO.....	15
1.3.1 SISTEMAS DE ANALISIS MICROBIOLOGICO.....	16
1.4 SISTEMAS DE DESINFECCION.....	19
2 MARCO METODOLÓGICO .....	22
2.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACION.....	22
2.2 UNIVERSO.....	22
2.3 TAMAÑO MUESTRAL.....	23
2.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	23
2.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	24
2.6 TÉCNICA DE ANÁLISIS DE DATOS.....	24
2.7 MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN.....	25

2.8	TOMA Y MANEJO DE LA MUESTRA .....	26
2.9	TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....	26
2.10	ELEMENTOS PARA EL DIAGNOSTICO.....	27
2.11	INDICADORES.....	27
2.12	VARIABLES.....	27
3	RESULTADOS.....	30
4	DISCUSION.....	38
5	PROPUESTA.....	40
	CONCLUSIONES.....	41
	RECOMENTACIONES.....	42
	BIBIOGRAFIA.....	43
	ANEXOS.....	52
	PROTOCOLO DE DIAGNOSTICO DE <i>Listeria monocytogenes</i> .....	52
	CUADROS DE RESULTADOS.....	58

**RESUMEN**

Introducción. La bacteria *Listeria monocytogenes*, es una bacteria gram positiva, no esporulada, aerobia anaerobia facultativa, puede ingresar a las plantas de procesamiento a través de la materia prima cárnica, y así llegar a la población vulnerable. Objetivo general: determinar *Listeria monocytogenes* en canales de vacuno, control microbiológico en la empresa Embutidos La Italiana, durante el periodo agosto – septiembre del año 2015. Objetivos específicos Aislar e identificar la *Listeria monocytogenes* en las muestras de carne fresca en las canales de carne de vacuno, durante la primera fase de recepción de la materia prima cárnica, mediante el método de aislamiento/enriquecimiento. Aislar e identificar la *Listeria monocytogenes* en las muestras de carne fresca en las canales de carne de vacuno, al final de la segunda fase de recepción de materia prima cárnica, mediante el método de aislamiento/enriquecimiento. Determinar la distribución de la contaminación bacteriana en las canales de vacuno, en el área de recepción de materia prima cárnica de la empresa. Diseñar el protocolo de diagnóstico para *Listeria monocytogenes*. La metodología utilizada es cuantitativa descriptiva, que incluye el enriquecimiento, inmuno-precipitación, e identificación bioquímica. Los resultados encontrados fueron que la bacteria *Listeria monocytogenes* tiene una presencia del 2.5% sobre los canales de vacuno, también se ha demostrado que el proceso de limpieza tiene un efecto drástico sobre la flora inicial y queda reducida en dos números logarítmicos. El protocolo para el diagnóstico e identificación de la bacteria es el adecuado.

**PALABRA CLAVE:** *Listeria monocytogenes*, vacuno, productos cárnicos, embutidos.

**ABSTRACT:**

Introduction. The bacterium *Listeria monocytogenes*, is a Gram-positive, non-spore bacteria, aerobic facultative, anaerobic can enter to the processing plants through the raw meat, and thus reach the vulnerable population. General objective: determine *Listeria monocytogenes* in channels of beef, microbiological control in the Italian sausage company, during the period August - September of the year 2015. Specific objectives to isolate and identify the *Listeria monocytogenes* in samples of fresh meat in the carcasses of beef during the first phase of the meat raw, using the method of isolation/enrichment. Isolate and identify the *Listeria monocytogenes* in samples of fresh meat in the carcasses of beef, at the end of the second phase of raw meat, using the method of isolation/enrichment. Determine the distribution of bacterial contamination in carcasses of cattle, in the area of reception of raw meat of the company. Design the diagnostic Protocol for *Listeria monocytogenes*. The methodology is quantitative descriptive, which includes enrichment, immuno-precipitation, and biochemical identification. The found results were that the bacterium *Listeria monocytogenes* has a presence of 2.5% over beef channels, has also been shown that the cleaning process has a drastic effect on the initial flora and is reduced in two logarithmic numbers. Protocol for diagnosis and identification of the bacterium is suitable.

**.KEYWORD:** *Listeria monocytogenes*, cattle, meat, sausage products.

## INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, el género *Listeria*, está representado por varias especies, siendo saprófitas en su gran mayoría, de todas ellas únicamente dos afectan a los mamíferos incluido el hombre y son la *Listeira monocytogenes* y la *Listeria ivanovii*, pero esta última afecta a los animales únicamente.

Al describir a la *Listeria monocytogenes* se encuentra que es un cocobacilo punteagudo Gram-positivo, aerobio anaerobio facultativo, cuyas dimensiones son 0,5 a 2  $\mu\text{m}$  de largo por 0,5  $\mu\text{m}$  de ancho, corto, regular, no esporulado, observados al microscopio se pueden aparecer bacterias aisladas, en grupo o cadenas cortas de 3 a 5 elementos, parejas conformando la forma de las letras “V” o “Y”, y a la tinción de Gram son positivas. (Betancur 2016).

La FAO, en su página web, describe a la carne como la parte blanda situada entre la piel y los huesos (principalmente músculos); también son consideradas como carne, las vísceras (hígado y riñones) de animales (mamíferos, reptiles y anfibios) y aves (particularmente pollo). La carne se subdivide en carne roja (vacunos, cabras, ovejas, cerdos, etc.), y carne blanca (aves de corral).

La bacteria *Listeria monocytogenes* es una de las bacterias causante de enfermedades que se transmite por los alimentos (ETAs), entonces para que un alimento

se considere inocuo para el consumo humano, debe cumplir el criterio microbiológico para un alimento, que se define la aceptabilidad de un producto o un lote de un alimento basada en la ausencia o presencia, o en la cantidad de microorganismos, incluidos parásitos, y/o en la cantidad de sus toxinas/metabolitos, por unidad o unidades de masa, volumen, superficie o lote. (Bover i Cid, Garriga i Turón 2014)

Los criterios microbiológicos pueden utilizarse para formular requisitos de diseño y para indicar, según proceda, el diagnóstico microbiológico requerido de las materias primas, los ingredientes y los productos terminados en cualquier fase de la cadena alimentaria. (FAO)

Los límites que se establezcan en los criterios deberán basarse en datos microbiológicos apropiados para el alimento y ser aplicables a una gama de productos análogos, en base de los resultados obtenidos en otras empresas similares o de actividades complementarias.

Si el criterio requiere la ausencia de un determinado microorganismo, deberán indicarse el tamaño y número de la unidad analítica (así como el número de unidades de la muestra analítica).

El problema de estudio, de esta investigación es el déficit en la detección de la *Listeria monocytogenes* en canales de vacuno en la empresa EMBUTIDOS LA ITALIANA – Cuenca, 2015.

La propuesta es diseñar un protocolo estandarizado para el diagnóstico de la bacteria *Listeria monocytogenes* en las canales de vacuno.

### **OBJETO DE ESTUDIO.**

*Listeria monocytogenes* en canales de vacuno.

### **CAMPO DE INVESTIGACION**

Control microbiológico de la materia prima, canales de vacuno, en la empresa Embutios La Italiana.

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En un principio, se conocía que la *Listeria monocytogenes*, es un patógeno de animales, no es sino desde un brote de listeriosis en la década de 1980, que se la relaciona con alimentos contaminados. (Sánchez 2016).

Los datos epidemiológicos de los últimos años en diversos países de la Unión Europea y en los Estados Unidos, la tasa anual media de listeriosis se sitúa en torno a los 0,3 a 0,41 casos/100.000 habitantes para el año 2012, dentro la de unión, el informe de EFSA – España, sitúa la tasa de listeriosis en el mismo año en 0,91 casos/100.000 habitantes. Mientras que en Canadá las autoridades de ese país ha declarado que de cada 2500 casos, la tasa de mortalidad es de 500. Con este precedente las autoridades españolas han determinado que lo que ha llevado a las autoridades a incluir dentro de su legislación que la *Listeria monocytogenes* en ausencia en 25g, para todas las carnes, derivados crudos, cocidos y madurados. (Robert et al, 2016)

En nuestro país, los análisis de detección de la bacteria, objeto de este estudio, está dirigida especialmente en la leche y sus derivados, como es el caso del Laboratorio Metropolitano de Quito que lo realiza regularmente, en la ciudad de Cuenca se ha realizado un estudio por parte de la Universidad del Azuay sobre los quesos vendidos al granel en los mercados de la ciudad de acuerdo a lo establecido por la NTE INEN 10:2012.

Dentro del Plan Nacional del Buen vivir, en el objetivo 6 de Objetivos Nacionales para el buen Vivir, en el objetivo 3, Mejorar la calidad de vida de la población, y en función del artículo 66 de la Constitución, establece el derecho a una vida digna, que asegure la salud, alimentación y nutrición, agua potable, vivienda, saneamiento ambiental, educación, trabajo, empleo descanso y ocio, cultura física, vestido seguridad social y otros servicios sociales necesarios.

El problema planteado es el déficit en la detección de la *Listeria monocytogenes* en canales de vacuno en la empresa EMBUTIDOS LA ITALIANA – Cuenca, 2015.

Al existir dentro de la población, portadores sanos en su sistema digestivo la bacteria, está en algún defecto dentro del proceso de faenamiento, puede llegar a través de las canales de res a las fábricas de procesamiento, y si no es eliminada existe un alto grado de posibilidad de que llegue al consumidor final, provocando la enfermedad, en cualquiera de sus manifestaciones, si éste se encuentra vulnerable desde el punto de vista inmunológico.

## JUSTIFICACION

Debido al déficit de detección de *Listeria monocytogenes* en las canales de vacuno en la empresa EMBUTIDOS LA ITALIANA en el año 2015.

En ésta investigación se justifica el diseño de un protocolo para el diagnóstico para la detección de la bacteria *Listeria monocytogenes*, con el fin de dar garantizar los productos que fabrica, la empresa aplica los lineamientos del sistema HACCP (Búsqueda y Análisis de Puntos Críticos de Control, por sus siglas en inglés) la empresa realiza estudios microbiológicos de las superficies de las canales, con el fin de verificar que los recuentos bacterianos se encuentren dentro de los límites establecidos por la norma nacional y comprobar si el sistema utilizado esté cumpliendo su objetivo.

La diagnóstico de la presencia de la bacteria *Listeria monocytogenes* es necesario como control microbiológico para las carnes y sus derivados.

### PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

- ¿Por qué es necesario el aislamiento e identificación de la carga microbiana en la materia prima cárnica, durante la primera fase de recepción de materia prima cárnica?, (previo a la limpieza).
- ¿Por qué es necesario el aislamiento e identificación de la carga microbiana en la materia prima cárnica, posterior a la segunda fase de recepción de materia prima cárnica?, (posterior a la limpieza).
- ¿Cómo determinamos la actividad del desinfectante?

- ¿Existe un protocolo para la determinación de *Listeria monocytogenes* en la empresa?

## **VIABILIDAD**

Este proyecto es totalmente factible pues se contó con los recursos necesarios, y se lo realizó con la autorización de los dueños de la empresa.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar *Listeria monocytogenes* en canales de vacuno, control microbiológico en la empresa Embutidos La Italiana, durante el periodo agosto – septiembre del año 2015.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 Aislar e identificar a *Listeria monocytogenes* en las muestras de carne fresca en las canales de carne de vacuno, durante la primera fase de recepción de la materia prima cárnica, mediante el método de aislamiento/enriquecimiento.
- 2 Aislar e identificar la *Listeria monocytogenes* en las muestras de carne fresca en las canales de carne de vacuno, al final de la segunda fase de recepción de materia prima cárnica, mediante el método de aislamiento/enriquecimiento.
- 3 Determinar la distribución de la contaminación bacteriana en las canales de vacuno, en el área de recepción de materia prima cárnica de la empresa.
- 4 Diseñar el protocolo de diagnóstico para *Listeria monocytogenes*.

## **HIPÓTESIS**

Las canales de carne de vacuno adquiridas en calidad de materia prima cárnica por la empresa cuencana EMBUTIDOS LA ITALIANA durante los meses de agosto y septiembre del año 2015, tienen un 2% de contaminación debido a la presencia de *Listeria monocytogenes*.

# 1 MARCO TEÓRICO

## 1.1 TEORIAS GENERALES.

### 1.1.1 LISTERIA MONOCYTOGENES

En la Universidad de Cambridge, en el año de 1926, los microbiólogos Murray, Webb y Swann, estudiaban una epizootia, encontraron una bacteria no detectada anteriormente la cual provocaba en conejos fiebre y monocitosis y le dieron el nombre de *Bacterium monocytogenes*, en 1957, se define como *Listeria monocitogenes*, en honor a Joshep Lister, quien la habría descrito por primera vez. (Sánchez, 2016)

#### 1.1.1.1 MORFOLÓGIA Y ESPECIES

En la naturaleza, el género *Listeria*, está representado por varias especies, siendo saprófitas en su gran mayoría, de todas ellas únicamente dos afectan a los mamíferos incluido el hombre y son la *Listeria monocytogenes* y la *Listeria ivanovii*, mientras que la *Listeria ivanovii* afecta a los animales únicamente.

Al género *Listeria* se lo ha clasificado dentro de la sub-rama *Clostridium* junto con *Staphylococcus*, *Lactobacillus* y *Bronchothrix*, y comprende las siguientes especies: *L. monocytogenes*, *L. invanovii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. aquatica*, *L. fleischmannii*, *floridensis*, *L. weihenstephanensis*, *L. Cornellensis* y *L. frandensis*. (Bover i Cid, Garriga i Turón 2014)

La *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), es un cocobacilo punteagudo, cuyas dimensiones son 0,5 a 2  $\mu\text{m}$  de largo por 0,5 $\mu\text{m}$  de ancho, corto, regular, no esporulado, observados al microscopio se pueden aparecer bacterias aisladas, en grupo o cadenas cortas de 3 a 5 elementos, parejas conformando la forma de las letras “V” o “Y”, a la tinción de Gram son positivas.

Es una bacteria invasiva, sus mecanismos de patogenicidad son poco entendidos aún, la característica más importante del germen es su capacidad para sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos

#### **1.1.1.2 FISIOLÓGÍA Y MEDIO AMBIENTE.**

Las condiciones de supervivencia puede ser aerobio – anaerobio facultativo; genera  $\beta$  hemolítica incipiente; es intracelular facultativo, y posee motilidad a 25° C, siendo un parásito facultativo del sistema retículoendotelial. (Bover i Cid, Garriga i Turón 2014)

La *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) puede encontrarse en los más diversos ambientes, aún en los extremos, como en la refrigeración. Se han reportado casos en los que, luego de varias congelaciones y descongelaciones reiteradas, durante dos años, se han encontrado bacterias viables. (Bover i Cid, Garriga i Turón 2014, y García et al 2015)

La supervivencia es muy amplia, se ha reportado casos como que en soluciones al 10% de sal, existe crecimiento bacteriano; incluso al combinar la refrigeración con soluciones de 25% de la sal, hay crecimiento luego de cuatro meses de su aplicación, el Potencial Hidrógeno (pH) no limita a la bacteria, pues todos los productos alimenticios que tengan el pH entre 4,3 a 10 son susceptibles de ser infectados por *L. monocytogenes*. Tal es el caso de la carne de vacuno cuyo pH, dependiendo de las condiciones de faenamiento, oscila entre 5,5 y 7,2, o de los productos cárnicos en los que el pH oscila entre 5,5 y 6,2, según las normas respectivas (Martinez 2015, Sánchez 2016)

La aplicación del calor debe realizarse en forma adecuada, pues los errores en la aplicación de este procedimiento de conservación provocan en la bacteria la activación de factores genéticos de stress que le ayudan a resistir el calor. (Bover i Cid, Garriga i Turón 2014)

#### **1.1.1.3 LISTERIOSIS HUMANA.**

En diversas partes del mundo, han reportado casos de listeriosis, dentro de lo cual lo que más llama la atención es la prevalencia en grupos cuyo sistema inmunológico se encuentra disminuido como es el caso de mujeres embarazadas, neonatos, personas con cáncer, diabetes, enfermedades renales, enfermedades del colágeno y personas con el virus de inmunodeficiencia adquirida. Para este tipo de pacientes, la dosis mínima de ingesta es de una sola bacteria para desarrollar la enfermedad, en lo que a humanos se refiere (Wang et al. 2015, Foster et al. 2012)

En personas que no padezcan ninguna de las enfermedades descritas el recuento está muy por encima, en estudios han demostrado que para desarrollar la infección es de  $1 \times 10^6$  bacterias, con un período de incubación que oscila entre 3 y 70 días (Sánchez, 2016)

Para que la infección por *L. monocytogenes* se produzca, es necesario que un hospedero susceptible la ingiera, y se activen las cualidades genéticas listeriales, expresadas por medio de proteínas útiles para la infestación, la cual se cumple en las siguientes cuatro etapas:

- Entrada a la célula del hospedero.
- Evasión de la vacuola intracelular y desarrollo dentro de la célula.
- Desplazamiento intracitoplasmático.
- Diseminación de célula a célula.

Estas cuatro etapas se desarrollan de acuerdo con la expresión de los genes de virulencia, localizados en zonas genéticas identificadas como Islas de Patogenicidad (PAIs), las cuales son transmitidas por vía horizontal y son de gran importancia para la evolución de la virulencia bacteriana.

Estos PAIs comprenden una sección de 9KDa conocida como PrfA dependiente de la isla 1 (LIPI – 1), y ésta genera los genes de virulencia *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* y *plcB*, mientras que en el exterior de la isla 1 están los genes: *hpt*, *inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ*. (Vera et al. 2013)

El ingreso al sistema celular del nuevo huésped es a través de dos sistemas, la primera es obligando a las células fagocíticas como macrófagos o linfocitos, a ser fagocitada, la interlinasa B (*InlB*) al buscar un dímero de aminoácidos Glicina – Triptófano (complejo GW), de la proteína de crecimiento del hepatocito, MET, en la membrana celular en la cual se ancla al fagocito y provoca la formación de una vacuola donde queda inmersa la bacteria. La segunda forma es obligando a una célula no fagocítica a fagocitarla con la ayuda de una glicoproteína la E – caderina y la interlinasa A (*InlA*), que genera una pseudo-vacuola donde la bacteria queda inmersa e ingresa a la célula.

Una vez dentro del citoplasma celular del hospedero, la *L. monocytogenes* se cubre con fragmentos de actina que se transforman en filamentos en pocas horas, brindándole la facilidad de moverse en el interior de la célula y hacia las células cercanas.

En el interior del fagolisosoma, el pH 5,5 y la baja concentración de hierro, provocan la activación del gen *hly* y éste genera una enzima denominada Listerio Lisina O (LLO), que es una citolisina sulfidrilo activada que gracias a su estructura de grupos sulfidrilos provoca la formación de poros en la membrana celular y la bacteria pasa a la siguiente célula, debido a que la LLO busca específicamente a las moléculas de colesterol donde se inicia la perforación celular. Este mecanismo listerial es utilizado para la determinación de *L. monocytogenes* in vitro, porque provoca la reacción de  $\beta$  – hemólisis en el agar sangre de cordero.

En el interior de la célula, manipula la estructura generando una proteína ActA, que atrapa moléculas de actina y genera el filamento bacterial de aproximadamente 73 monómeros y con la ayuda del ión calcio y el ATP genera movilidad que han

determinado una velocidad de 0,05 a 0,3  $\mu\text{m}$  por segundo. De esta forma empieza a ejercer presión desde el interior de la membrana celular de su hospedero hasta provocar prolongaciones denominadas filópodos o protrusiones, haciendo que la membrana celular del primer hospedero se introduzca en la célula vecina. De esta manera queda encerrada en un fagosoma secundario de doble membrana.

Los síntomas de la enfermedad gastrointestinal son: fiebre, dolor muscular, dolor de cabeza, tensión de cuello, cansancio, gripe con dolores y molestias, náuseas, vómito y diarrea, que pueden preceder a formas más serias de listeriosis o pueden aparecer de 9 a 48 horas luego de la infección. El período de incubación en personas adultas es de 3 a 70 días; en bebés infectados al momento de nacer, el período de incubación es de 1 a 4 semanas después del nacimiento.

Las listeriosis fetomaternal y neonatal resultan de la transmisión de la infección madre – feto por vía transplacentaria con desarrollo de corioamnionitis, si ocurre durante el sexto mes de embarazo o antes ocasionan daños en el embrión y el subsecuente aborto, pasado el sexto mes puede generar partos pre término o la muerte del feto.

En adultos, afecta el sistema nervioso central en un 55 a 70% de los casos. Normalmente se desarrolla como una meningoencefalitis acompañada por trastornos severos de la conciencia, desórdenes en el movimiento y, en algunos casos, parálisis en los nervios craneales, rigidez abrupta del cuello como en pacientes inmunocomprometidos.

La *L. monocytogenes* se disemina por vía sanguínea al sistema nervioso central; puede ocasionar meningitis supurativa aguda, cerebritis focal o multifocal, meningoencefalitis, absceso cerebral o espinal y listeriosis bulbar o romboencefalitis.

#### **1.1.1.4 LISTERIOSIS BOVINA.**

En los bovinos al listeriosis tiene diferentes manifestaciones dependiendo de la edad del animal, así en los recién nacidos se presenta como septicemia generando abscesos en vísceras tales como hígado, bazo y linfonódulos, encefalitis, queratoconjuntivitis y uveítis y mastitis, también puede provocar abortos. En los animales adultos por lo general ataca al sistema nervioso central, provocando depresión o excitabilidad, anorexia y disfunción de los nervios craneanos, con efectos asimétricos con ptosis mandibular, estrabismo, ptosis del pabellón auricular, torsión de la cabeza, marcha en círculos por lo que se le conoce como “la enfermedad de los círculos”. (Gallego, 2015)

#### **1.1.2 MATERIA PRIMA CÁRNICA.**

Durante miles de años el hombre, en su afán de almacenar la carne obtenida de los animales de caza, ha inventado múltiples maneras de conservarla, inicialmente, la colocó en hogueras, luego la cocinó, y posteriormente gracias al avance del conocimiento y desarrollo de la tecnología ha logrado congelar, refrigerar y almacenarla por periodos más largos. Al mismo tiempo ha evolucionado el procesamiento de carne que permite mantenerla apta para el consumo como son los embutidos o derivados cárnicos.

Por definición la carne es:

Tejido muscular estriado en fase posterior a su rigidez cadavérica (post-rigor), comestible, sano, y limpio e inocuo de animales de abasto que mediante la inspección veterinaria oficial antes y después del faenamiento son declarados aptos para consumo humano, de acuerdo a la norma NTE INEN 1217:2013.

En la misma norma específica que la Canal o Carcasa del animal es el cuerpo del animal faenado, desangrado, eviscerado, sin genitales y en las hembras sin ubres; de acuerdo a la especie animal con o sin cabeza, piel, patas, diafragma y médula espinal.

Según la FAO, el aporte nutricional por cada 100g de una canal de vacuno incluye un 16.5% de proteína, 28% grasa, con un aporte energético de 1351 kJ., con aporte de vitaminas del grupo B y minerales como Hierro, Fósforo, Zinc y Potasio, el pH que en condiciones normales de faenamiento oscila entre 5.5 y 7.2, dando las condiciones necesarias para crecimiento bacteriano.

## **1.2 TEORIAS SUSTANTIVAS.**

### **1.2.1 CONTROL MICROBIOLÓGICO.**

Antes de ingresar a sistemas de control microbiológico, es necesario hablar de prevención, con sistemas adecuados con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM / GMP de sus siglas en inglés), se puede evitar la contaminación y más si el sistema utilizado es de Análisis de Puntos Críticos de Control (HACCP de sus siglas en inglés) (Sánchez, 2016)

En la Unión Europea, se ha establecido los PARÁMETROS DE SEGURIDAD ALIMENTARIA PARA LA CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS DESTINADOS A

LA UNIÓN ECONÓMICA DE EURASIA, a principios del 2016, para todo tipo de carnes desde la canal hasta el corte más pequeño, en la cual el criterio microbiológico para la *Listeria monocytogenes* es de ausencia en 25g de muestra. (Normas UA 2016).

Para el Programa Nacional De Vigilancia Microbiológica en Alimentos, del Ministerio de Salud del Gobierno de Chile, el control microbiológico es la vigilancia sanitaria orientada al control de los riesgos y las amenazas para la Salud Pública, mediante el levantamiento de la información sistemática sobre la inocuidad de los alimentos que apoye el análisis de ocurrencia de eventos de Enfermedad Transmitida por los Alimentos (ETA), para el año 2015 el programa se dedicó a la identificación de tres (3) agentes patógenos de importancia en salud pública, como son *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp., considerando en algunos períodos a *E. coli* O157 H7. (Ministerio de Salud. Chile 2015).

En nuestro país, el criterio microbiológico para está especificado en la norma NTE INEN 2346, CARNE Y MENUDECENCIAS COMESTIBLES DE ANIMALES DE ABASTO. REQUISITOS, en la cual únicamente para la revisión del 2016 se reduce el número de bacterias a detectar. (Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2016).

### **1.2.2 SISTEMAS DE ANALISIS MICROBIOLÓGICO.**

Con el transcurrir de los tiempos desde Pasteur, padre de la microbiología Clásica, se han venido aplicando al análisis de los alimentos, lo principal es la detección del agente, cabe recalcar que el *Patón de oro* siguen siendo las pruebas clásicas de aislamiento e identificación, cualquier otro método es comparado con ellas para definir su

eficiencia y eficacia. Los métodos modernos llamados también pruebas rápidas utilizan agentes selectivos y procedimientos de enriquecimiento reduciendo el número de microorganismos contaminantes y permitiendo la multiplicación de *Listeria monocytogenes*. (Wang et al, 2015, AOAC 2017, FDA 2017, De Santos 2010)

Existen en la actualidad muchos sistemas que ofrecen aislar e identificar a *Listeria monocytogenes* de la muestra, basado en diferentes comportamientos de la bacteria utilizando su capacidad de adaptabilidad al medio, es así que se han descrito varias técnicas como se describe a continuación:

MEDIOS DE CULTIVO, siendo este el método de la bacteriología clásica, es extremadamente largo, y poco aplicable a los estándares de calidad actual como es el sistema HACCP (por sus siglas en inglés), se ha descrito que es requisito realizar los pasajes semanales a bajas temperaturas con el fin de aislar a las bacterias por su capacidad de sobrevivir a bajas temperaturas como es 29°C.

Posteriormente se incluyeron medios de cultivo con ingredientes que pueden soportar la bacteria y eliminar a las otras especies, como son los caldos FRASER, UVM, OXFORD modificado, y la temperatura de trabajo con los que se trabaja ya a 30, 35 o 37°C, y tiempos de pre-enriquecimiento o enriquecimientos muchos más cortos entre 72 y 24, gracias a la incorporación de antibióticos como acriflavina, ácido nalidixico, cicloheximida, colistina, cefotetan, fosfomicina, también a la actividad de sales como el cloruro de litio.

PRUEBAS RAPIDAS, para una detección oportuna de la *Listeria monocytogenes*, han salido al mercado prueba que se basan en la especificada del género como son las pruebas bioquímicas que de acuerdo a la positividad o negatividad del resultado dan un resultado indican la presencia o ausencia de la bacteria y se debe realizar la confirmación mediante métodos FDA.

TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS se han presentado para la identificación como son los métodos de enzimoimmunoensayo con una variante colorimétrica monoclonal, también se dispone de pruebas de inmunoprecipitación, que una vez verificada la presencia del género listeria se debe continuar con los procedimientos de la bacteriología clásica hasta la identificación de la especie.

Se debe notar que todas las pruebas se inician en caldos de enriquecimiento, pasan a la identificación de género y de ellas continuar con las pruebas bioquímicas de caracterización, que ya son una disminución en el tiempo de trabajo en el laboratorio.

PRUEBAS SEROLÓGICAS. Este tipo de pruebas se basan en la determinación de la anti-listeriolisina O, que para pruebas clínicas en el sistema nervioso central, si bien no es específica para *Listeria monocytogenes*, pero ha sido muy útil para determinar el agente causal en caso de cultivos negativos, porque el organismo desarrolla anticuerpos contra la listeriolisis O, el factor de virulencia de esta bacteria, que con la ayuda del método E.L.I.S.A.

PRUEBAS BASADAS EN ADN. Con el desarrollo tecnológico llegaron las pruebas basadas en secuenciación de genes específicos de la *Listeria* como son los genes

hly, específico para *Listeria monocytogenes*. Dentro de este tipo de análisis, la caracterización por electroforesis de campo pulsado, donde se cambia la polaridad de los electrodos ha diferenciado a la bacteria de un cocktail preparado varios tipos de bacterias de diferentes orígenes. (Wang, et al.. 2015)

### **1.2.3 SISTEMAS DE DESINFECCION.**

La descontaminación de la materia prima es imperiosa, además de eliminar a la flora que en ella habita no debe causar daño ni a la materia prima ni a los posibles consumidores, también hay que recordar que en la época actual la “conciencia verde” está en todos los campos, y la industria de alimentos no puede quedar al margen, y no se diga sobre la utilización de antibióticos o sustancias conservantes.

Varias son los tipos de estudios que se han realizado al respecto, entre ellos:

LA IRRADIACION. Consiste en la aplicación de rayos gamma, electrones de alta energía, cobalto 60 y cesio-137, rayos X, haz de electrones que pueden matar agentes patógenos, así como la microflora nativa evitando el deterioro del producto aplicado, tiene muchas ventajas como no requiere la adición de sustancias químicas, no dejar residuos, alta eficiencia, bajo consumo de energía, flexible y adaptable, no altera el sabor de los productos.

Como todo método requiere una normativa y es así que la FDA en el año 2014 ha impuesto los siguiente límites o dosis máxima de 3.0 kGy para aves de corral, 4.5 kGy

para la carne refrigerada y 7.0 kGy para la carne congelada, y como información al consumidor debe ir etiquetado el tipo de radiación que ha recibido.

**ALTA PRESION.** Esta tecnología se basa en el principio de Pascal, la presión se transmite de manera uniforme y al mismo tiempo, de una manera adiabática (sin importar la forma o el tamaño). Se aplica ambientes entre 100 y 600 MPa, se ha determinado ser muy eficiente, sin embargo existe la posibilidad de un incremento de temperatura durante el proceso, no genera “sudoraciones” por el cambio térmico o ruptura de membranas celulares. A diferencia de la anterior, no requiere etiquetado específico de anuncio al consumidor.

**DERIVADOS DEL BACTERIAS ACIDO LACTICAS.** Bacterias como lactococcus streptococcus, pediococcus, leuconostoc y bacilos de los géneros Lactobacillus y Carnobacterium, generadores de ácido láctico, acético, peróxido de hidrógeno, diacetaldehído, reuterina y bacteriocinas, generando un lucha muy desequilibrada entre las bacterias lácticas y la flora de la materia prima, lo que es ayudado por el descenso del pH hasta niveles no aceptables para la mayoría de los patógenos, eliminándolos por competencia por el consumo de carbohidratos.

**ENVASES INTELIGENTES.** Todo compuesto orgánico al medio ambiente tiene a deteriorarse, y más con la ayuda del oxígeno. Por ello este tipo de conservación lo que hace es aislar al producto del ambiente, para ello hay varias metodologías como son al vacío, es la eliminación de todo el gas atmosférico dejando al producto sin gas, con ello las bacterias naturales y contaminantes no tienen acceso al oxígeno siendo eliminadas de esta forma. Atmósfera modificada, este es la mezcla de gases en proporciones calculadas para

evitar cambios en la apariencia. Es una mezcla de gases inertes, CO<sub>2</sub> y oxígeno de tal forma que no se pueda sobrevivir ningún microorganismo. Muy útil para productos al por menor

**BACTERIOFAGOS.** En la década del 1910-1920, varios autores han insinuado que se podría utilizar a los bacteriófagos como sistema de control de bacterias en alimentos, pero no es hasta 2010, en la cual se puede determinar que agente es el más eficiente en contra de las bacterias patógenas, y es así que Carlton lograron secuenciar al bacteriófago P100 específico para *Listeria monocitogenes*, también se ha determinado que el fago EcoShield es efectivo contra E. Coli O157: H7, LisiShiel para la *Listeria monocitogenes*, Salmofresh para la Salmonella entérica. (Jorquera et al 2015)

### **1.3 REFERENTES EMPIRICOS.**

En el desarrollo de la investigación la mayoría de los estudios están centrados en productos que están listos para la venta, sean estos crudos, loncheados, y listos para el consumo, en ellos los referentes para estos últimos en España realizaron estudios anuales entre el 2009 y el 2013, donde se evidenció un crecimiento del porcentaje de prevalencia de acuerdo a la norma europea de ausencia en 25g., que subió del 2009 que tenía una prevalencia de 8,1% y para el año 2013 sube a un 9,2% (García Bemejo 2014).

En Chile, en estudio realizado en heces de vacuno y de carne molida, se evidenció que la incidencia de *Listeria monocitogenese* en las heces es baja (0,4%), pero al compararlo con los resultados obtenidos en la carne molida es muy alta (37%). (Foerster, Vidal, Troncoso, Figueroa. 2012)

En Colombia en el año 2004, realizaron un estudio en canales de ganado vacuno en una planta de sacrificio, de un universo de 1600 canales, se examinaron 133 y de ellas el 2.26% tuvieron un resultado positivo para *Listeria monocytogenes*. (Gallego, et al, 2015).

Dentro de las NORMAS DE SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIÓN ECONÓMICA DE EURASIA REGLAMENTOS TÉCNICOS UEE N° 34/2013 Y 21/2011 figura que la bacteria *Listeria monocytogenes* debe estar ausente en 25g, desde la canal hasta los cortes pequeños.

Las normas ecuatoriana sobre carnes y derivados no señalan el aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes*.

Heredia et al., en 2014, señala que la calidad microbiológica de las carnes está en función de los microorganismos indicadores sean o no patógenos como Enterobacterias, Streptococos, Listeria, Campylobacter, Clostridium perfringens y Yersinia.

Delgado et al., en su trabajo de tesis *Calidad higiénica de la carne obtenida en mataderos de Manabí- Ecuador*. Universidad Técnica de Manabí, en 2015, hace un recuento de la calidad microbiológica de la canales de vacuno, en su resumen indica que los conteos de los microorganismos seleccionados como indicadores de higiene fueron superiores a lo permitido en varias de las normas empleadas como referencias.

López, indica en su tesis, indica que en la ciudad de Torreón los resultados alcanzan valores de incontables en aerobios, existe presencia de Salmonella spp., coliformes

fecales y totales, en general por encima de la Norma Oficial Mexicana NOM-034-SSA1-1993.

Moyano et al., en su estudio MONITOREO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE CANALES BOVINAS PROVENIENTES DE UNA FAENADORA DE VILLA MARÍA, CÓRDOBA, ARGENTINA, presenta los resultados están por debajo de los límites de la norma europea, con la implementación de las buenas prácticas de manufacturas implementadas de la Directiva 64/433/CEE de la Unión Europea.

En el año 2015. Cesar Martinez y Adriana Verhelst, sacan las siguientes conclusiones para la calidad microbiológica de plantas de beneficio:

- Las fuentes de contaminación puede ser cualquier medio: agua, ambiente, suelo, heces, alimentos, utensilios e incluso el hombre.
- El transporte juega un papel importante
- La contaminación puede ser en fresco o elaborado.
- La carne que es procesada o manipulada inadecuadamente, puede ser una importante fuente de contaminación e intoxicación alimentaria, siendo un riesgo para la salud pública.

## **2 MARCO METODOLOGICO**

### **2.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

El presente estudio corresponde a un diseño cuantitativa – descriptiva. Tiene como finalidad determinar la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en las canales de carne de vacuno adquiridas como materia prima cárnica por la empresa EMBUTIDOS LA ITALIANA, localizada en la ciudad de Cuenca, durante el mes de agosto septiembre del año 2015.

El tipo de estudio que se realizó es descriptivo – prospectivo.

### **2.2 UNIVERSO.**

El universo es el número de canales de carne de vacuno que la empresa EMBUTIDOS LA ITALIANA adquirió como materia prima cárnica, durante los meses de agosto y septiembre del 2015, cumpliendo los requisitos de la SENASA y los establecidos por la empresa. Estos últimos son los siguientes:

- Haber sido faenadas en el camal municipal del cantón Cuenca.
- Haber permanecido en las cámaras de refrigeración durante un día en la empresa de faenamiento a una temperatura inferior a los 8° C.

- Tener un peso comprendido entre 186 y 260 kg.

Los datos requeridos por el Departamento de Control de Calidad se anotaron en el REGISTRO DE DATOS PRIMARIOS.

### **2.3 TAMAÑO MUESTRAL**

El número total de unidades de canales de carne de vacuno a las cuales se procedió a tomar la muestra fue de 160 (ciento sesenta), en función de los criterios de inclusión y de exclusión; además de las directrices de las normas de la SENASA e INEN NTE 776 que se refieren al muestreo de carnes en las plantas.

### **2.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Para el muestreo se consideró:

- Canales de carne de vacuno que ingresaron a la empresa cumpliendo los requisitos internos de la empresa, descritos en el universo de estudio y señalados en el registro de datos primarios. Con estos parámetros, se tomó la primera muestra.
- El muestreo se realizó de martes a viernes de cada semana, durante los meses de agosto setiembre del año 2015.
- El horario de toma de muestra fue entre las 08h00 y las 12h00.

La segunda muestra se tomó a los 15 minutos de aplicarse el proceso de limpieza y desinfección, e ingresada como materia prima.

## **2.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Para este estudio se excluirá:

- Toda materia prima cárnica que no esté como canal y que no sea de vacuno para aceptación, o que incumpla los requisitos internos de la empresa, descritos en el universo de estudio y señalados en el registro de datos primarios
- Las canales de vacuno que llegaron a la empresa los días lunes y sábado.
- Las canales de vacuno que ingresaron después de las 12 horas, en consideración a que el incremento de la temperatura de la canal sobrepasa a la de refrigeración.
- Las canales que por algún motivo no fueron incluidas durante el primer muestreo.

## 2.6 TÉCNICA DE ANÁLISIS DE DATOS

Para este trabajo se utilizó la metodología estadística descriptiva, fundamental para evaluar la presencia de *L. monocytogenes* en las canales de carne de res, mediante: razón, proporción, comparación.

## 2.7 MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN

Este estudio se realizará en el mes de agosto septiembre del año 2015, con la autorización del dueño de la empresa EMBUTIDOS LA ITALIANA.

El muestreo comprende las canales de carne de vacuno adquiridas durante el proceso de Recepción de Materia Prima Cárnica; se realizó en el área que dispone la empresa para el efecto, donde se trabaja siguiendo los lineamientos del artículo N° 3 del reglamento de la SENASA que describe las áreas de muestreo en la canal y señala que el número de muestras a tomar son cinco unidades representativas de la producción diaria, lo que concuerda con la norma INEN 776.

A fin de documentar el presente trabajo, se tomó 20 muestras en la semana, distribuidas en 5 diarias de martes a viernes, en horario de 8 a 12 horas y que cumplan con las especificaciones de EMBUTIDOS LA ITALIANA.

Los análisis se realizaron de acuerdo con la técnica establecida para cada bacteria. Este análisis comprende:

La detección de *L. monocytogenes* mediante la técnica descrita por la norma AOAC 997.03, y complementada con método FDA.

Una vez realizado el análisis, los resultados se los anotó en el formato de registro de análisis de muestra.

La información obtenida con este trabajo de investigación tiene fines académicos y la información se entregará a la empresa únicamente.

## **2.8 TOMA Y MANEJO DE LA MUESTRA**

- Para este estudio, las muestras se obtuvieron de las canales de vacuno aceptadas y registradas en la hoja de Registro de Datos Primarios.
- Las muestras se tomaron de martes a viernes de cada semana en un número de cinco diarias, durante el período de estudio, de acuerdo con los criterios de inclusión y de exclusión.
- Para transportar las muestras, se las mantiene a 4° C hasta su arribo al laboratorio para el análisis respectivo; el análisis no debe realizarse pasadas las 24 horas después de tomada la muestra.

Una vez obtenida la muestra se procederá a llenar el REGISTRO DE DATOS PRIMARIOS, conforme a lo establecido en la norma NTE INEN 776.

## **2.9 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA**

El método de identificación de *L. monocytogenes* que se aplicó es el descrito en la técnica la de AOAC 997.03 e identificación con el método y como standart positivo *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, y para la detección de otras bacterias se procederá de acuerdo con las técnicas de las placas Petrifilm en función de las exigencias de la norma NTE INEN 2346:2016.

## **2.10 ELEMENTOS PARA EL DIAGNÓSTICO**

Los elementos que sirvió para el diagnóstico de la presencia o ausencia de la bacteria *L. monocytogenes* son: el aislamiento bacteriano de las muestras provenientes de las canales de vacuno y la disminución considerable de los recuentos de las otras bacterias.

## **2.11 INDICADORES**

Los indicadores que se tomó en cuenta en la investigación son los porcentajes de presencia o ausencia de la bacteria *L. monocytogenes* en las canales de carne de vacuno y la disminución en el recuento de otras bacterias.

## **2.12 VARIABLES**

VARIABLES Independientes:

- Presencia de *L. monocytogenes* en canales de vacuno, antes y después del proceso de limpieza y desinfección.

VARIABLES DEPENDIENTES:

- Control microbiológico de los canales de vacunos: de flora total, Enterobacterias, *Staphylococcus aureus*, antes y después del proceso de limpieza y desinfección.

VARIABLES INTERVINIENTES:

- Proceso Operativo Estandarizado de limpieza y desinfección de materia prima cárnica.

Control de los sobrevivientes de flora total, Enterobacterias, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* en las superficies de los canales a los 15 minutos de efectuado el proceso de limpieza y desinfección.

**CUADRO DE OPERACIONALIZACION DE LA VARIABLES**

<b>variable</b>	<b>DEFINIR</b>	<b>DIMENSIÓN</b>	<b>INDICADORES</b>	<b>INSTRUMENTO</b>	<b>ITEM</b>
variable independiente	<b>Listeria monocytogenes:</b> cocobacilo, Gram positivo, no esporulado, punteagudo, intracelular	área específica de toma de muestra	presencia / ausencia	muestreo microbiológico sobre la especie del animal de abasto	Microbiología
<i>Listeria monocytogenes</i> en canales de vacuno	<b>canales de vacuno:</b> Canal (carcasa). Es el cuerpo del animal faenado, desangrado, eviscerado, sin genitales y en las hembras sin ubres; de acuerdo a la especie animal con o sin cabeza, piel, patas, diafragma y médula espinal, proveniente de ganado vacuno	especie de animal de abasto	día de arrivo a la empresa	cronológico	Norma de referencia
variable dependiente	<b>control microbiológico:</b> que se define la aceptabilidad de un producto o un lote de un alimento basada en la ausencia o presencia, o en la cantidad de microorganismos, incluidos parásitos, y/o en la cantidad de sus toxinas/metabolitos, por unidad o unidades de masa, volumen, superficie o lote,	norma técnica de referencia	presencia / ausencia, Lm y otras especies bacterias según NTE	inmuno prescipitación	Método AOAC 997.03 y FDA PARA <i>Listeria monocytogenes</i>
control microbiológico de canales de vacuno	<b>Empresa de embutidos:</b> empresa dedicada a la elaboración de productos cárnicos procesados sean estos cocidos, pre-cocidos, curados o crudos, utilizando una o varias especies en sus procesos	empresa especializada	actividad comercial	RUC	Documento legal
variable interviniente	<b>desinfectante:</b> producto químico, diseñado para disminuir o eliminar cargas bacterianas	conjunto de ácidos orgánicos	pH	control microbiológico	Ficha técnica
	<b>tiempo de acción,</b> tiempo en el cual el desinfectante requiere para que sus efectos sean medibles	tiempo	cronológico	cronológico	Ficha técnica

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 TOMA DE MUESTRAS PARA MICROBIOLOGÍA**

Composición que se tomaron las muestras en el transcurso de las ocho semanas en las cuales se desarrolló el estudio fueron de ciento sesenta muestras.

#### **3.2 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS**

Los resultados de las muestras microbiológicas fueron, de acuerdo al planteamiento divididas entre antes del proceso de limpieza y desinfección, y, posterior al proceso de limpieza y desinfección.

Para las muestras tomadas antes del proceso de limpieza y desinfección, los resultados demuestran que el recuento presente en la superficie de las canales es elevado sobrepasando los límites establecidos por la norma NTE INEN 2346:06.

De los datos obtenidos de las muestras microbiológicas obtenidas luego de proceso de limpieza y desinfección, éstas indican que la actividad del desinfectante utilizado como paso previo al almacenamiento es efectivo para disminuir la carga bacteriana de las superficies de las canales.

### 3.2.1 RESULTADOS DE *Listeria monocytogenes*.

De los ciento sesenta casos estudiados, únicamente se ha identificado en las muestras tomadas antes del proceso de limpieza y desinfección, la presencia de la bacteria *Listeria monocytogenes* en un porcentaje muy cercano a lo descrito en la bibliografía internacional. Mientras que, de las muestras tomadas luego del proceso de limpieza y desinfección en ninguna se obtuvo resultado positivo para *Listeria monocytogenes*.

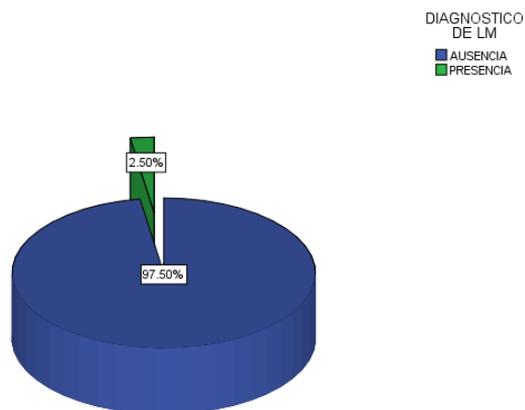
### 3.2.2 INCIDENCIA DE *Listeria monocytogenes*.

Según el primer objetivo específico que es *Listeria monocytogenes* en las muestras de carne fresca en las canales de carne de vacuno, durante la primera fase de recepción de la materia prima cárnica, mediante el método de islamiento/enriquecimiento, los resultados obtenidos durante el tiempo transcurrido del trabajo investigativo se obtuvieron cuatro muestras positivas de las ciento sesenta muestras recolectadas y estudiadas, lo que equivale a un 2,5%.

			FASE		
			ANTES DEL TRATAMIENTO	DESPUES DEL TRATAMIENTO	Total
DIAGNOSTICO DE <i>Listeria monocytogenes</i>	AUSENCIA	Recuento	156	160	316
		% del N de la columna	97.5%	100.0%	98.8%
	PRESENCIA	Recuento	4	0	4
		% del N de la columna	2.5%	0.0%	1.3%

Esta tabla nos indica la presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* antes y después del tratamiento. Antes del tratamiento, existen solo 4 casos (2,5%) de los 160 que contienen *Listeria monocytogenes*.

**DIAGNOSTICO DE *Listeria monocytogenes***  
**(ANTES DEL TRATAMIENTO)**



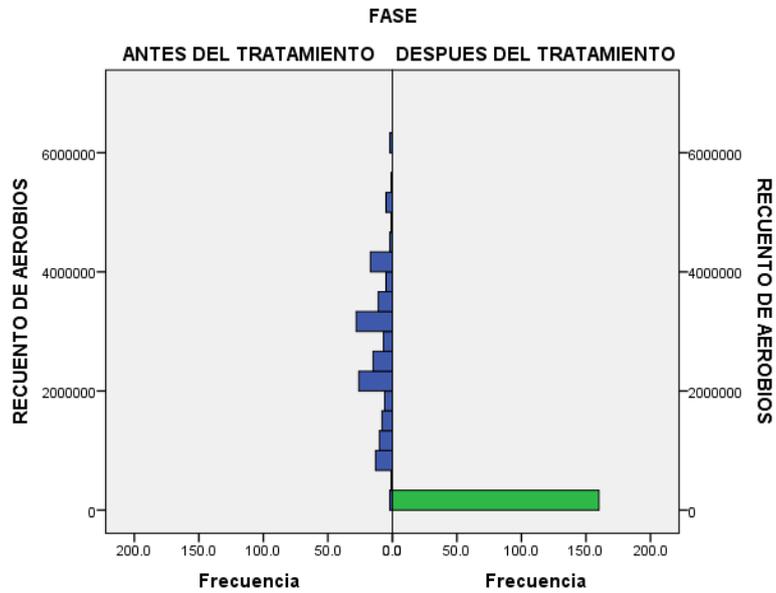
Según el segundo objetivo específico que es *Listeria monocytogenes* en las muestras de carne fresca en las canales de carne de vacuno al final de la segunda fase de recepción de materia prima cárnica, mediante el método de aislamiento/enriquecimiento, los resultados obtenidos durante el tiempo transcurrido del trabajo investigativo no se obtuvieron muestras positivas de las ciento sesenta muestras recolectadas y estudiadas.

### 3.2.3 DISTRIBUCION DE LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA.

En lo referente al tercer objetivo específico, antes y después del proceso de limpieza y desinfección es la siguiente:

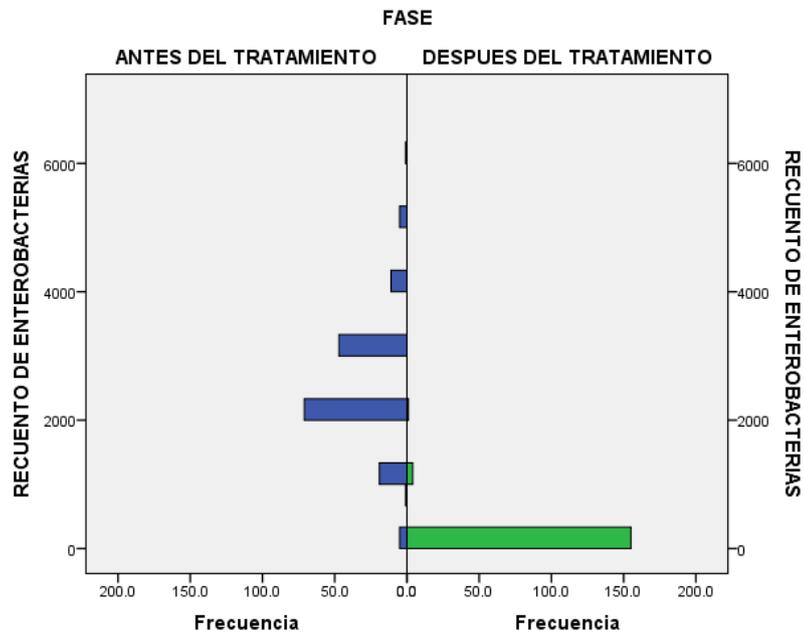
		FASE	
		ANTES DEL TRATAMIENTO	DESPUES DEL TRATAMIENTO
RECuento DE AEROBIOS	Media	2'671.750	12.737
RECuento DE ENTEROBACTERIAS	Media	2.367	67
RECuento DE S.AUREUS	Media	230	8

GRAFICO AEROBIOS MESOFILOS TOTAL (Flora total)



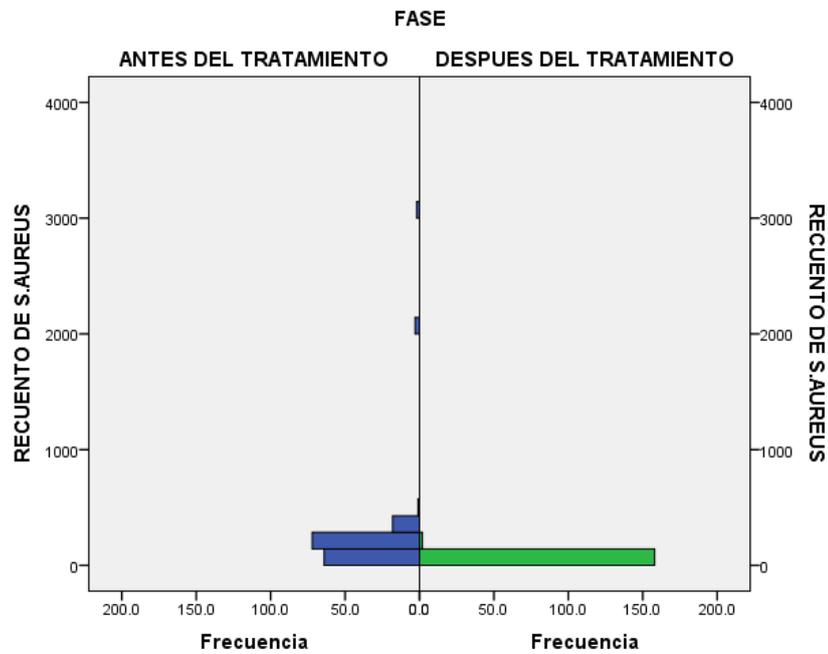
En el proceso de limpieza y desinfección, se puede observar la presencia de Aerobios mesófilos totales, antes y después del tratamiento, donde la disminución logarítmica es de 2, con lo cual la materia prima es aceptada en función de la norma INEN 2346.

## GRAFICO ENTEROBACTERIAS



En el proceso de limpieza y desinfección, se puede observar la presencia de Enterobacterias, antes y después del tratamiento, donde la disminución logaritmica es de 1, con los cual la materia prima es aceptada en función de la norma INEN 2346.

GRAFICO S. AUREUS



En el proceso de limpieza y desinfección, se puede observar la presencia de *Staphylococcus aureus*, antes y después del tratamiento, donde la disminución logaritmica es de 2, con los cual la materia prima es aceptada en función de la norma INEN 2346.

Los resultados fueron obtenidos con la ayuda del programas SPSS-2, con la ayuda de las fórmulas de Hipótesis estadística bilateral:

$$H_0: \phi = \phi_0$$

$$H_1: \phi \neq \phi_0$$

$$t = \frac{M_x - M_y}{\sqrt{\left[ \frac{\left( \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N_x} \right) + \left( \sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{N_y} \right)}{N_x + N_y - 2} \right] \cdot \left[ \frac{1}{N_x} + \frac{1}{N_y} \right]}}$$

$\Sigma$  = sum the following scores  
 $M_x$  = mean for Group A  
 $M_y$  = mean for Group B  
 $X$  = score in Group 1  
 $Y$  = score in Group 2  
 $N_x$  = number of scores in Group 1  
 $N_y$  = number of scores in Group 2

## 4 DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos, la presencia en canales de vacuno se ha determinado en un 2,5%, siendo para la fecha de la realización de este estudio, una índice enmarcado en la realidad de países que llevan un control, como en Colombia es 2.26% a fechas cercanas a la realización del este estudio. (Gallego et al. 2015).

En los países mencionados, en Chile, Argentina, México, los Estados Unidos y la Unión Europea, tiene regulaciones que controlan la presencia en esta especie de animales de abasto, en el cual la detección es obligatoria para canales o carcasas, con lo cual las precauciones para los subproductos y derivados es controlada donde reglamentariamente se estableció como ausencia en 25g de muestra, y en el caso del Japón que tiene un régimen de tolerancia cero, y lo que ha llevado a la no importación de carnes y derivados de países como España que tiene rangos más altos en los indicadores de listeriosis humana. (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, España, 2016, )

Actualmente la prevalencia se ha incrementado a ubicarse en un 3,5% de estudios realizados en Colombia y Chile, también se demuestra que la bacteria *Listeria monocytogenes*, está presente en más de un alimento. (Ministerio de Salud Pública, Colombia, 2014; Programa Nacional de vigilancia microbiológica en Alimentos, Ministerio de Salud, Chile, 2015).

El organismo de regulación ecuatoriana, INEN, determina únicamente su detección en uno de los alimentos más consumidos por la personas que es la leche, debido al ser una bacteria que por su mecanismo de infección llega hasta las ubres de los rumiantes y puede ser fuente de contaminación. (NTE INEN 10:2012)

Se debe recordar que al ser una bacteria saprofita en el medio ambiente, presente en los alimentos que consumen los rumiantes, este puede albergarse al interior del tracto intestinal de los rumiantes y llegar al ser humano, recordemos que existen portadores asintomáticos de la bacteria entre 2 al 10% según Buchanan et al., en 2017, por lo cual por si ya es un riesgo para la población que ingiere carne y sus derivados.

## 5 PROPUESTA.

Al final de este trabajo de investigación, se ha presentado el protocolo para el diagnóstico e identificación de *Listeria monocytogenes* a la empresa EMBUTIDOS LA ITALIANA.

El procedimiento está diseñado para que no cubra únicamente las carcasas de canales de vacuno, sino para que pueda ser aplicable a todas las áreas de la empresa, que incluyen áreas de trabajo y superficies de trabajo.

Se fundamenta en el enriquecimiento y aislamiento de la bacteria con medios específicos, luego se tamiza en función de la inmuno-presipitación , para completar con la identificación bioquímica.

## CONCLUSIONES:

- La presencia de *Listeria monocytogenes* en las canales de carne de vacuno se ha demostrado, y que se puede de esta forma ingresar a las empresas embutidoras.
- La limpieza y desinfección de la materia prima es indispensable para evitar el ingreso de la planta de procesamiento, siendo de esta forma la primera barrera que debe tratarse antes de su liberación para el proceso productivo.
- La validación de los procedimientos de limpieza y desinfección deben ser realizados, incluyendo a bacteria *Listeria monocytogenes*, para evitar su ingreso a la planta de procesamiento.
- El procedimiento implementado para el diagnóstico e identificación de *Listeria monocytogenes*, ha permitido incorporar un nuevo protocolo para seguir trabajando dentro de la mejora continua en el sistema de Buenas Prácticas de Manufactura.

## RECOMENDACIONES

- La presencia de *Listeria monocytogenes* en las canales de carne de vacuno demostrada, se vuelve necesaria el diagnóstico en la demás área del área productiva.
- El sistema de validación de los procedimientos operativos estandarizado de limpieza y desinfección, debe incluir el estudio sobre la efectividad de eliminación de *Listeria monocytogenes*.
- Dentro de los estudios de control de calidad, deberían incluir dentro del cronograma de Control de Calidad, la búsqueda e identificación de *Listeria monocytogenes* en producto terminado tanto en productos cocidos, pre-cocidos y crudos.

## BIBLIOGRAFIA

1. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. Buchanan, Gorris, Hayman, Jackson, Whiting. FOOD CONTROL. 2016.12.016. Disponible en: [http://ac.els-cdn.com/S0956713516306892/1-s2.0-S0956713516306892-main.pdf?\\_tid=8a29e632-5685-11e7-8024-00000aacb361&acdnat=1498051900\\_fe9647657f6e1a8dc12b15b0dcdf4a03](http://ac.els-cdn.com/S0956713516306892/1-s2.0-S0956713516306892-main.pdf?_tid=8a29e632-5685-11e7-8024-00000aacb361&acdnat=1498051900_fe9647657f6e1a8dc12b15b0dcdf4a03)
  
2. An Outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with Corn Contaminated by *Listeria monocytogenes*. Aureli, Fiorucci, Caroli, Marchiaro, Novara, Leone, Salmaso. THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE. 2000. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM200004273421702>
  
3. Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consume. 2014. Disponible en: [www.irta.cat](http://www.irta.cat)
  
4. EVALUACIÓN DE RIESGOS DE *Listeria monocytogenes* EN PRODUCTOS CÁRNICOS LISTOS PARA SU CONSUMO EN ESPAÑA. Garcia, Bermejo Rivas. Tesis de Máster Universitario en Gestión de la Calida y Seguridad Alimentaria. Curso 2014/2015. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/54508/GARC%C3%8DA-B%C3%89JAR%20->

- %20Perfil%20de%20riesgo%20de%20Listeria%20monocytogenes%20en%20alimentos%20derivados%20c%C3%A1rnicos%20(Evalua....pdf?sequence=2
5. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from human Listeriosis cases in China. Wang, Jiao, Lan, Xu, Liu, Wang, Zhang, Pang, Jin, Dai, Yuan, Zhang, Xu, Ye. [www.nature.com](http://www.nature.com) Letter to the editor. 2015. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4576168/pdf/emi201550a.pdf>
  6. Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Salmonella spp., *Listeria monocytogenes*, and Escherichia coli O157:H7 in Meat Samples. Kawasaki, Horikoshi, Okada, Takeshita, Sameshima, Kawamoto, Journal of Food Protection, Vol. 68, No. 3, 2005, Disponible en: <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-68.3.551>
  7. Descontaminación microbiana de canales. Interempresas.net. 2014. Disponible en: <http://www.interempresas.net/Alimentaria/Articulos/130026-Descontaminacion-microbiana-de-canales.html>
  8. Caracterización molecular y evaluación del riesgo de *Listeria monocytogenes* en carne de vacuno y ave. Avances en Ciencias Veterinarias V27 N° 2 2012. Claudia Foerster, Guillermo Figueroa. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/273030134>
  9. Evaluación de riesgo de *Listeria monocytogenes* en salchicha, jamón, mortadela y salchichón en Colombia. MSP Colombia 2014. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/investigacion/ueria/Publicaciones/ER%20LISTERIA%20EN%20CARNICOS.pdf?Mobile=1&Source=%2Flineas%2Dde%2Daccion%2Finvestigacion%2Fueria%2F%5Flayouts%2Fmobile%2Fview%2Easpx%3FList%3Dfac7484e%252Dcd21%252D44af%252D>

7cd%252D99ca83c6771b%26View%3D4ab893b6%252D0fac%252D43df%252Da8cb%252D3f066d1656f9%26CurrentPage%3D1

10. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cattle and ground beef by pulsedfield gel electrophoresis. Revista Argentina de Microbiología. Foerster, Vidal, Troncoso, Figueroa. 2012. Disponible en:  
<https://www.researchgate.net/publication/232718832>
  
11. El desafío de controlar las enfermedades transmitidas por alimentos: bacteriófagos como una nueva herramienta biotecnológica. Infectología al Día. Jorquera, Galarce y Borie. 2015. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v32n6/art10.pdf>
  
12. Calidad microbiologica de carne bovina en plantas de beneficio, 2015. Martínez P. Cesar et al./@limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria 13(2015) 72-80
  
13. Meningitis por *Listeria monocytogenes* con ADA elevado en paciente inmunocompetente. Betancur, Mejía, Posada. Colombia. 2016. Disponible en:  
<http://www.scielo.org.co/pdf/amc/v41n2/v41n2a14.pdf>
  
14. Determinación de *Listeria Monocytogenes* en lomo relleno expandido en supermercados de la Ciudad Capital De Guatemala. Tesis Colón Virginia., 2015. Disponible en:  
<http://www.repositorio.usac.edu.gt/867/1/TESIS%20VIRGINIA.pdf>

15. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. Palomino, González. 2014. Disponible en:  
<http://www.rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/93/1932>
  
16. Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos. MARTÍN DE SANTOS. 2010. Disponible en:  
<https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1108/1125>
  
17. PRINCIPALES FACTORES DE RIESGO DE SEPSIS NEONATAL EN PACIENTES DEL HOSPITAL JOSÉ MARÍA VELASCO IBARRA DE TENA EN EL PERIODO NOVIEMBRE 2015 – MARZO 2016. Tite, Olivo. 2016. Disponible en:  
<http://186.3.45.37/bitstream/123456789/5598/1/PIUAMED005-2017.pdf>
  
18. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS CARNES MOLIDAS EXPENDIDAS EN EL MERCADO LA CONDAMINE DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA. Tesis ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. 2016. Jara, Escobar. Disponible en:  
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4977/1/56T00627%20UDCTFC.pdf>
  
19. *Listeria monocytogenes*: UN RETO PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA, SÁNCHEZ. 2016. Disponible en:  
[https://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/130555/1/Listeria\\_monocytogenes\\_un\\_reto\\_para\\_la\\_seguridad.pdf](https://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/130555/1/Listeria_monocytogenes_un_reto_para_la_seguridad.pdf)

20. CARNE Y MENUDENCIAS COMESTIBLES DE ANIMALES DE ABASTO. REQUISITOS. NORMA TECNICA ECUATORIANA, NTE INEN 2346-16.
  
21. CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS. DEFINICIONES NORMA TECNICA ECUATORIANA NTE INEN 1217:2013
  
22. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS. NTE INEN 1529-1
  
23. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. TOMA, ENVÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO. NTE 1529-2
  
24. REGLAMENTO TÉCNICO ECUATORIANO RTE INEN 056:2013
  
25. *Listeria monocytogenes*. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2004. Disponible en: [http://www.academia.edu/9716497/CAP%C3%8DTULO\\_2.10.14.\\_LISTERIA\\_MONOCYTOGENES](http://www.academia.edu/9716497/CAP%C3%8DTULO_2.10.14._LISTERIA_MONOCYTOGENES)
  
26. VALIDACIÓN DE PCR PARA DETECCIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN CARNES CRUDAS DE RES Y POLLO. Torres, Poutou, Carrascal, Sierra, Mercado. 2004. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/693/69390202.pdf>

27. Listeriosis en bovinos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Grupo de Sanidad Animal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Margineda, Cantón, Lischinsky, Moreira, Campero. 2012. Disponible en:  
<http://www.scielo.org.ar/pdf/revet/v23n1/v23n1a06.pdf>
28. *Listeria monocytogenes* como patógeno alimentario. Un enfoque hacia la industria cárnica. Gonzalez. 2015. Disponible en: <http://studylib.es/doc/3118656/gonzalez-rosas--mart%C3%ADn--2015--listeria-monocytogenes-com...>
29. INFLUENCIA DE LA LISTERIOSIS EN LA FERTILIDAD Y PRESENTACIÓN DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN UN CONGLOMERADO LECHERO DE LA SABANA DE BOGOTÁ, COLOMBIA. Gallego, Azumendi, Salazar, Gallego. 2015. Disponible en:  
<http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v18n2/v18n2a14.pdf>
30. COMPOSICIÓN DE LA CARNE. FAO. Disponible en:  
[http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr\\_composition.html](http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_composition.html)
31. Evaluación del “PROGRAMA NACIONAL DE VIGILANCIA MICROBIOLÓGICA EN ALIMENTOS”. Ministerio de Salud. Chile. 2015. Disponible en: <http://www.deis.cl/wp-content/uploads/2016/12/Evaluaci%C3%B3n-del-Programa-de-Vigilancia-Microbiologica-a%C3%B1o-2015.pdf>

32. GUIA SIMPLIFICADA PARA EL ENTENDIMIENTO Y USO DE OBJETIVOS DE INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS Y OBJETIVOS DE RENDIMIENTO. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. ICMSF 2006. Disponible en:  
<http://www.icmsf.org/pdf/FSO%20Objectives/GuiaSimplificadospdf>
33. Control Microbiológico de Alimentos. GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS. 2013. Argentina. Disponible en: <http://www.qo.fcen.uba.ar/quimor/wp-content/uploads/2013/09/GUIA-TP-CONTROL-2013.pdf>
34. Utilización de ácido láctico como desinfectante en canales bovinos. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO 2015 Yanchaliquín, López. Disponible en:  
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3837/1/27T0271%20YANCHALIQUE%20ADRIANA%20GEOVANNA.pdf>
35. Parámetros de seguridad alimentaria para la carne y productos cárnicos destinados a la unión económica de EURASIA, 2016. Ministerio de sanidad, servicios sociales e igualdad. España. Disponible en:  
[https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/sanidadExterior/docs/Normas\\_UA\\_carne\\_y\\_productos\\_carnicos.pdf](https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/sanidadExterior/docs/Normas_UA_carne_y_productos_carnicos.pdf)
36. Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. 2014. Disponible en:  
<http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v56n6/v56n6a16.pdf>

37. Productos cárnicos: principales patógenos y estrategias no térmicas de control.  
NACAMEH Vol. 8, Sup. 1, pp. S20-S42, 2014 Norma Heredia, Dávila-Aviña, Solís,  
Santos. 2014. Disponible en: <http://confia.com.co/documents/articulo%20aleja.pdf>
38. Objetivos del Buen Vivir. Objetivo 6. 2017. Disponible en: <http://www.buenvivir.gob.ec/>
39. Testing Methodology for *Listeria* species or *L. monocytogenes* in Environmental Samples.  
2015. Disponible en:  
<https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/UCM467056.pdf>
40. BAM: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Bacteriological Analytical  
Manual, Chapter 10.FDA, 2017. Disponible en:  
<https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071400.htm>
41. *Listeria monocytogenes*. es.scribd.com. disponible en:  
<https://es.scribd.com/doc/45949299/LISTERIA-MONOCYTOGENES>
42. Detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en carne de res  
en puntos de venta en México. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, vol. 4, núm. 1,  
enero-marzo, 2013, pp. 107-115. 2013. Rubio Lozano, Martínez Bruno, Hernández  
Castro, Bonilla Contreras, Méndez Medina, Núñez Espinosa, Echeverry, Alejandro, Mindy  
M. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265625754002>
43. *Listeria monocytogenes* IN CARCASSES OF HOLSTEIN CATTLE IN A  
SLAUGHTERHOUSE OF THE SABANA DE BOGOTA (COLOMBIA). 2004. Gallego,  
Manrique, Torres, Ramírez. Disponible en:

- [https://www.researchgate.net/publication/261358179\\_Listeria\\_monocytogenes\\_en\\_canales\\_de\\_ganado\\_Holstein\\_en\\_una\\_planta\\_de\\_sacrificio\\_en\\_la\\_sabana\\_de\\_Bogota\\_Colombia](https://www.researchgate.net/publication/261358179_Listeria_monocytogenes_en_canales_de_ganado_Holstein_en_una_planta_de_sacrificio_en_la_sabana_de_Bogota_Colombia)
44. Calidad microbiológica de carne bovina en plantas de beneficio. Martínez, Verhelst, 2015. Disponible en:  
[http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:nlCRCm45aXII:revistas.unipamp.lona.edu.co/ojs\\_viceinves/index.php/ALIMEN/article/download/1648/838+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=ec](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:nlCRCm45aXII:revistas.unipamp.lona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/ALIMEN/article/download/1648/838+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=ec)
45. Calidad higiénica de la carne obtenida en mataderos de Manabí- Ecuador. Universidad Técnica de Manabí, 2015 Delgado Hipatia, Cedeño Carlos, Montes de Oca Nivian, Villoch Alejandra. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v37n1/rsa01115.pdf>
46. MONITOREO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE CANALES BOVINAS PROVENIENTES DE UNA FAENADORA DE VILLA MARÍA, CÓRDOBA, ARGENTINA. Moyano S.; Tabasso M.; Reynoso J.; Marín G. Facultad Regional Villa María - Universidad Tecnológica Nacional. Villa María, Córdoba, Argentina. 2015. Disponible en: <http://www.publitem.com.ar/contenido/objetos/Monitoreodelacalidad.pdf>
47. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA CARNE FRESCA DE RES A LA VENTA, EN MERCADOS DE LA COMARCA LAGUNERA. López Enriqueta. 2016. Disponible en:  
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/8252/ENRIQUETA%20CRUZ%20LOPEZ.pdf?sequence=1>
48. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments, Robert L. Buchanan, Leon G.M. Gorris, Melinda M. Hayman, Timothy C. Jackson, Richard C. Whiting, 2017, ELSERVIER FOOD CONTROL. Disponible en:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516306892>

49. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. Vera A., González G., Domínguez M. y Bello H. Universidad de Concepción, Concepción, Chile. *Rev Chilena Infectol* 2013;. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v30n4/art10.pdf>

**ANEXOS.**

**ANEXO 1**

**PROTOCOLO DE DIAGNOSTICO DE**

*Listeria monocytogenes*

En canales de vacuno

## **VISION DE LA EMPRESA:**

Ser líder a nivel nacional en la producción y comercialización de alimentos sanos y nutritivos en su segmento, con productos elaborados con la más alta tecnología de acuerdo a normas de calidad reconocidas internacionalmente, respetuosos del medio ambiente y de nuestro entorno, contribuyendo al desarrollo del país, con un equipo de trabajo comprometido e innovador que satisfaga adecuadamente las necesidades de nuestro consumidores

## **MISION DE LA EMPRESA:**

Alimentar y servir con satisfacción.

## **INTRODUCCION.**

Al ser la bacteria *Listeria monocytogenes*, una de los gérmenes causales de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs), es necesaria su detección antes de su ingreso a la planta de procesamiento de la empresa EMBUTIDOS LA ITALIANA.

El presente protocolo incluye una fusión entre las técnicas clásicas y la inmunoprecipitación, con el fin de disminuir el tiempo de detección, además de que sea práctica y no muy onerosa desde el punto de vista económico.

## **OBJETIVOS:**

**Objetivo General:** Detectar la bacteria *Listeria monocytogenes*, sobre las canales de carne de vacuno

**Objetivo Específico:** Diseñar un protocolo estandarizado para la detección de la *Listeria monocytogenes*, en las canales de carne de vacuno.

## **MATERIALES**

- Estufa a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Estufa a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

- Micropipeta 100ml - 1ml
- Asa de cultivo, punta redonda
- Vortex
- Mecheros de bunsen
- Balanza de hasta 1000g, / 0,1g
- Fundas estériles 8 onz
- Hisopos de algodón, caño largo
- Autoclave
- Frascos 250ml para microbiología
- Tubos de ensayo 13mm con tapa rosca para microbiología
- Toma muestras para superficies 10 x 10 cm, con asa.
- Refrigerador
- Microscopio 1000x

### **MEDIOS:**

- Medio de cultivo Frase modificado
- Cloruro de litio
- Caldo de enriquecimiento para listeria (BLEB)
- Unidad de Inmunoprecipitación Visual (VIP listeria)
- Kit de Tinción de Gram
- Medio Agar Sangre
- Sangre de cordero, desfibrilada
- Medio de SIM
- Glicerina
- Azúcares simples: Glucosa, Ramnosa, Xilosa, Manitol.

## **PROCEDIMIENTO**

### **PRE-ANALITICOS: TOMA DE LA MUESTRA.**

En el área de recepción de materia prima cárnica, luego de la selección de las canales receptadas, se procede con la toma de la muestra.

Con un hisopo de algodón de caña larga, en las áreas de las canales de vacuno muestreadas fueron: cuello, pecho, falda y cadera, de acuerdo con la normativa 2001/471/ce de la SENASA. Con un hisopo de algodón estéril, se tomará la muestra de una superficie de 10 cm. de largo por 10 cm. de ancho; el ángulo que forma el hisopo con la canal no debe ser mayor a los 30°; se tomará la muestra frotando el hisopo con movimientos usará un hisopo por cada área. El conjunto de hisopos se considerará como una muestra y se guardará en una funda tipo WHIRL PAK estéril., y se transporta en frío hasta el arribo al laboratorio.

### **ANALITICOS: EN EL LABORATORIO**

En un ambiente previamente esterilizado, a la fundas donde se colocaron los hisopos se agregan 60ml del caldo Fraser modificado con Cloruro de litio, a la mitad de concentración, y se incuba  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 28 horas  $\pm 2$  horas, o se puede agregar el caldo a los frasco de microbiología y los hisopos.

Transcurrido el tiempo se toma 1ml, y se agregan a tubos de ensayo con 9 ml del caldo Fraser modificado con Cloruro de Litio, se homogeniza en el vortex, a la mitad de concentración, y se los incuba a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas  $\pm 2$  horas.

A cada tubo se los homogeniza con la ayuda del vortex, y de ellos se transfiere 1ml a un tubo de ensayo vacío, se sumerge durante 5 minutos en el baño maría a ebullición, o a la llama del mechero de bunsen se calienta hasta ebullición por 1 segundo, con ello todas las bacterias han sido inactivadas.

Mientras se inactiva a las bacterias, se colocan la cantidad de unidades de VIP Listeria del refrigerador para que se aclimaten al medio ambiente del área de trabajo.

Se marcan las unidades de acuerdo a la muestra y se procede a colocar en la perforación de muestra 100  $\mu$ l y se espera 10 minutos, al final del tiempo si aparecen dos líneas paralelas significa que bacterias del género listeria están presentes en la muestra, si hay únicamente una línea no existen bacterias del género listeria.

De las muestras positivas, con la ayuda del asa punta redonda, se siembran en el agar sangre de cordero al 5%, y se deja durante 24 horas a  $37^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

De las colonias con  $\beta$ -hemólisis incipiente, se realizan las siguientes pruebas:

- Tinción de Gram,
- Pruebas de Catalasa,
- Oxidasa
- Fermentación de azúcares al 1% y como indicador púrpura de bromo cresol: Manitol, Glucosa, Xilosa y Ramnosa.

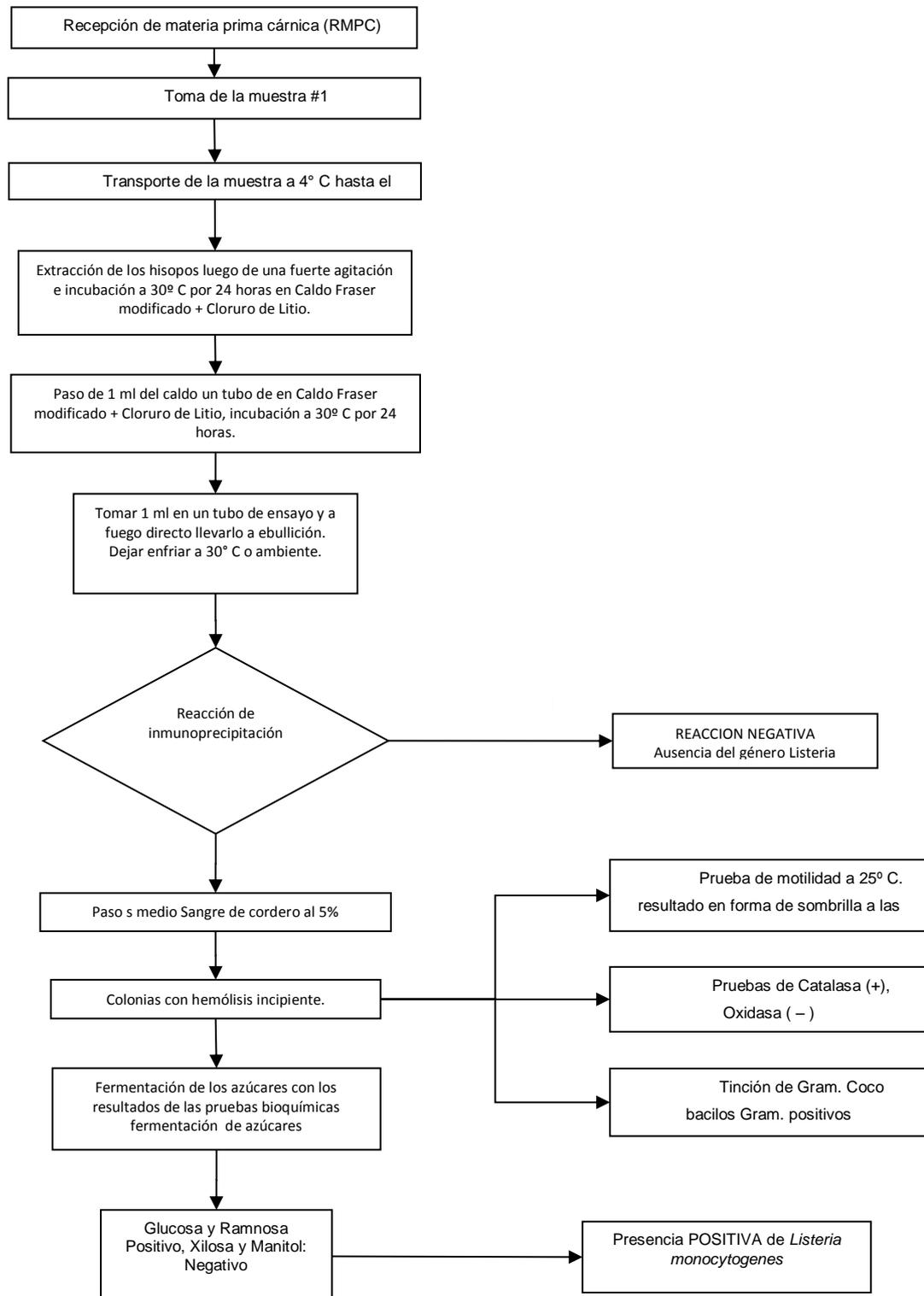
#### **POST-ANALITICOS: RESULTADOS**

- VIP Listeria, AOAC 997.03. resultado positivo para el género Listeria.
- En agar sangre de cordero 5%,  $\beta$ -hemólisis incipiente
- Tinción de Gram: cocobacilos Gram positivos, puntiagudos y formando las letras “V” o “Y”
- Pruebas de Catalasa (+),
- Oxidasa ( - )
- Fermentación azúcares simples al 1%, Glucosa y Ramnosa Positivo, Xilosa y Manitol: Negativo.

**POST- OPERATORIOS: RESULTADOS**

A los tubos que se realizaron la prueba de VIP Listeria, se los pueda almacenar a temperaturas de 2-4° C, para que puedan ser confirmados por técnicas más avanzadas como es la P.C.R. simple, RT-PCR (en tiempo real), gel de electroforeses de campo pulsante.

## DIAGRAMA DE FLUJO DE DIAGNÓSTICO DE *Listeria monocytogenes*



## ANEXO 2

DESCRIPTIVOS DE RECUENTO BACTERIA ANTES Y DESPUES DEL  
TRATAMIENTO

		FASE	
		ANTES DEL TRATAMIENTO	DESPUES DEL TRATAMIENTO
RECUENTO DE AEROBIOS	Media	2671750	12737
	Mediana	2600000	12000
	Moda	2000000	12000
	Mínimo	300000	600
	Máximo	6100000	160000
	Percentil 25	1950000	10000
	Percentil 75	3450000	14000
RECUENTO DE ENTEROBACTERIAS	Media	2367	67
	Mediana	2000	0
	Moda	2000	0
	Mínimo	100	0
	Máximo	6000	2000
	Percentil 25	2000	0
	Percentil 75	3000	100
RECUENTO DE S.AUREUS	Media	230	8
	Mediana	200	0
	Moda	200	0
	Mínimo	0	0
	Máximo	3000	200
	Percentil 25	100	0
	Percentil 75	200	0

		FASE	
		ANTES DEL TRATAMIENTO	DESPUES DEL TRATAMIENTO
RECuento de AEROBIOS	Media	2,67E+06	1,27E+04
	Mediana	2,60E+06	1,20E+04
	Moda	2,00E+06	1,20E+04
	Mínimo	3,00E+05	6,00E+02
	Máximo	6,10E+06	1,60E+05
	Percentil 25	1,95E+06	1,00E+04
	Percentil 75	3,45E+06	1,40E+04
RECuento de ENTEROBACTERIAS	Media	2,37E+03	6,70E+01
	Mediana	2,00E+03	0,00E+00
	Moda	2,00E+03	0,00E+00
	Mínimo	1,00E+02	0,00E+00
	Máximo	6,00E+03	2,00E+03
	Percentil 25	2,00E+03	0,00E+00
	Percentil 75	3,00E+03	1,00E+02
RECuento de S.AUREUS	Media	2,30E+02	8,00E+00
	Mediana	2,00E+02	0,00E+00
	Moda	2,00E+02	0,00E+00
	Mínimo	0,00E+00	0,00E+00
	Máximo	3,00E+03	2,00E+02
	Percentil 25	1,00E+02	0,00E+00
	Percentil 75	2,00E+02	0,00E+00

¿LOS VALORES MEDIOS DE LAS BACTERIAS ANALIZADAS SON IGUALES  
ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO?

$H_0$  = los valores medios de las bacterias analizadas (AEROBIOS) son iguales antes y después del tratamiento

$H_a$  = los valores medios de las bacterias analizadas (AEROBIOS) no son iguales antes y después del tratamiento

Nivel de confianza 95%

Nivel de significancia 0,05%

Estadísticos de grupo

FASE		N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
RECUBRIMIENTO DE AEROBIOS	ANTES DEL TRATAMIENTO	160	2671750.00	1221365.639	96557.432
	DESPUES DEL TRATAMIENTO	160	12737.50	12424.594	982.250

## Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Se han asumido varianzas iguales	313.046	.000	27.537	318	.000	2659012.500	96562.428	2469030.563	2848994.437
RECUE NT DE AEROBIOS No se han asumido varianzas iguales			27.537	159.033	.000	2659012.500	96562.428	2468302.373	2849722.627

De acuerdo a los resultados obtenidos en la muestra tomada antes y después del tratamiento, no existe evidencia estadística suficiente para aceptar la hipótesis nula, por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa de que los valores medios de las bacterias analizadas (AEROBIOS) no son iguales antes y después del tratamiento.

¿LOS VALORES MEDIOS DE LAS BACTERIAS ANALIZADAS SON IGUALES ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO?

Ho= los valores medios de las bacterias analizadas (ENTEROBACTERIAS) son iguales antes y después del tratamiento

Ha = los valores medios de las bacterias analizadas (ENTEROBACTERIAS) no son iguales antes y después del tratamiento

Nivel de confianza 95%

Nivel de significancia 0,05%

Estadísticos de grupo

	FASE	N	Med ia	Desviació n típ.	Error típ. de la media
RECUENTO DE ENTEROBACTERIAS	ANTES DEL TRATAMIENTO	160	236 7.50	1025.005	81.034
	DESPUES DEL TRATAMIENTO	160	66.5 6	222.224	17.568

## Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
RECuento de ENTEROBACTERIAS	Se han asumido varianzas iguales	185.337	0.000	27.750	318	0.000	2300.938	82.916	2137.804	2464.071
	No se han asumido varianzas iguales			27.750	173.914	0.000	2300.938	82.916	2137.286	2464.589

De acuerdo a los resultados obtenidos en la muestra tomada antes y después del tratamiento, no existe evidencia estadística suficiente para aceptar la hipótesis nula, por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa de que los valores medios de las bacterias analizadas (ENTEROBACTERIAS) no son iguales antes y después del tratamiento.

¿LOS VALORES MEDIOS DE LAS BACTERIAS ANALIZADAS SON IGUALES ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO?

Ho= los valores medios de las bacterias analizadas (S. AUREUS) son iguales antes y después del tratamiento

Ha = los valores medios de las bacterias analizadas (S. AUREUS) no son iguales antes y después del tratamiento

Nivel de confianza 95%

Nivel de significancia 0,05%

Estadísticos de grupo

	FASE	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
RECuento DE S.AUREUS	ANTES DEL TRATAMIENTO	160	229.50	411.648	32.544
	DESPUES DEL TRATAMIENTO	160	7.69	30.801	2.435

## Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias							
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia		
								Inferior	Superior	
RECuento de S.AUREUS	23.068	.000	6.797	318	.000	221.813	32.635	157.606	286.019	
				160.780						.000

De acuerdo a los resultados obtenidos en la muestra tomada antes y después del tratamiento, no existe evidencia estadística suficiente para aceptar la hipótesis nula, por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa de que los valores medios de las bacterias analizadas (S. AUREUS) no son iguales antes y después del tratamiento.

¿LOS VALORES MEDIOS DE LAS BACTERIAS ANALIZADAS SON IGUALES EN PRESENCIA O AUSENCIA DE LA BACTERIA LM?

$H_0$  = los valores medios de las bacterias analizadas (AEROBIOS) son iguales en presencia o ausencia de la bacteria LM

$H_a$  = los valores medios de las bacterias analizadas (AEROBIOS) son iguales en presencia o ausencia de la bacteria LM

Nivel de confianza 95%

Nivel de significancia 0,05%

Estadísticos de grupo

	DIAGNOSTICO DE LM	N	Media	Desviació n típ.	Error típ. de la media
RECUENTO DE AEROBIOS	AUSENCIA	316	1322841.77	1577756.325	88755.728
	PRESENCIA	4	2875000.00	1750000.000	875000.000

## Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
RECuento de AEROBIOS	Se han asumido varianzas iguales	.005	.944	-1.953	318	.052	-1552158.228	794717.118	-3115725.970	11409.515
	No se han asumido varianzas iguales			-1.765	3.062	.174	-1552158.228	879489.954	-4319273.643	1214957.188

De acuerdo a los resultados obtenidos en la muestra tomada en presencia y ausencia de la bacteria LM, existe evidencia estadística suficiente para aceptar la hipótesis nula, por lo tanto, los valores medios de las bacterias analizadas (AEROBIOS) son iguales en presencia y ausencia de la bacteria LM.

¿LOS VALORES MEDIOS DE LAS BACTERIAS ANALIZADAS SON IGUALES SON IGUALES EN PRESENCIA O AUSENCIA DE LA BACTERIA LM?

Ho= los valores medios de las bacterias analizadas (ENTEROBACTERIAS) son iguales en presencia o ausencia de la bacteria LM

Ha = los valores medios de las bacterias analizadas (ENTEROBACTERIAS) son iguales en presencia o ausencia de la bacteria LM

Nivel de confianza 95%

Nivel de significancia 0,05%

Estadísticos de grupo

	DIAGNOSTICO DE LM	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
RECuento DE ENTEROBACTERIAS	AUSENCIA	316	1194.46	1356.432	76.305
	PRESENCIA	4	3000.00	1414.214	707.107

## Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
RECuento de ENTEROBACTERIAS	Se han asumido varianzas iguales	.428	.514	-2.644	318	.009	-1805.538	682.775	-3148.865	-462.211
	No se han asumido varianzas iguales			-2.539	3.070	.083	-1805.538	711.212	-4039.905	428.829

De acuerdo a los resultados obtenidos en la muestra en presencia y ausencia de la bacteria LM, no existe evidencia estadística suficiente para aceptar la hipótesis nula, por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa de que los valores medios de las bacterias analizadas (ENTEROBACTERIAS) no son iguales antes y después del tratamiento.

¿LOS VALORES MEDIOS DE LAS BACTERIAS ANALIZADAS SON IGUALES SON IGUALES EN PRESENCIA O AUSENCIA DE LA BACTERIA LM?

Ho= los valores medios de las bacterias analizadas (S. AUREUS) son iguales en presencia o ausencia de la bacteria LM

Ha = los valores medios de las bacterias analizadas (S. AUREUS) son iguales en presencia o ausencia de la bacteria LM

Nivel de confianza 95%

Nivel de significancia 0,05%

Estadísticos de grupo

	DIAGNOSTICO DE LM	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
RECUENTO DE S.AUREUS	AUSENCIA	316	118.20	313.283	17.624
	PRESENCIA	4	150.00	191.485	95.743

## Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Se han asumido varianzas iguales	.014	.906	-.202	318	.840	-31.804	157.163	-341.015	277.408
RECuento DE S.AUREUS No se han asumido varianzas iguales			-.327	3.207	.764	-31.804	97.351	-330.622	267.014

De acuerdo a los resultados obtenidos en la muestra tomada en presencia y ausencia de la bacteria LM, existe evidencia estadística suficiente para aceptar la hipótesis nula, por lo tanto, los valores medios de las bacterias analizadas (S. AUREUS) son iguales en presencia y ausencia de la bacteria LM.



Cuenca, Septiembre 13 de 2017

Doctor  
**Guillermo Campuzano Castro**  
 Coordinador de Post Grado Universidad de Guayaquil  
 Ciudad.

De mi consideración:

Por medio del presente, comunico a usted que el Dr. Claudio Sánchez, solicitó realizar su trabajo de investigación para la Universidad de Guayaquil dentro de la empresa que dirijo, el mismo que ha sido autorizado.

Atentamente,

**Ing. Telmo Durán Suárez**  
 Gerente General Italimentos Cia. Ltda.

*Ing. Telmo Durán S.*  
 Gerente Italimentos Cia. Ltda.

## Urkund Analysis Result

**Analysed Document:** SANCHEZ MOROCHO CLAUDIO PAR URKUND.docx (D30282850)  
**Submitted:** 2017-08-29 16:57:00  
**Submitted By:** jacqueline\_velastegui@hotmail.com  
**Significance:** 3 %

### Sources included in the report:

<http://www.fao.org/docrep/006/W0073S/w0073s0x.htm>  
[https://archive.org/stream/ec.nte.1217.2006/ec.nte.1217.2006\\_djvu.txt](https://archive.org/stream/ec.nte.1217.2006/ec.nte.1217.2006_djvu.txt)  
[http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es/2.10.14\\_Listeria\\_monocytogenes.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.10.14_Listeria_monocytogenes.pdf)  
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/4779/1/Trabajo%20final.pdf>

### Instances where selected sources appear:

5

*Donna Carmen Alvarado de Chavez MSC*