



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
University of Oviedo

# Prevalencia de contaminación bacteriana en tres matrices de alimentos: pastelería, comida preparada y productos cárnicos



CRISTINA GONZÁLEZ-QUEVEDO REVUELTA

CURSO 2018-2019

JUNIO



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
University of Oviedo



Dr. ALEJANDRO VÁZQUEZ MARTÍN, Director técnico del laboratorio de la empresa AsturBiotech

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “Prevalencia de contaminación bacteriana en tres matrices de alimentos: pastelería, comida preparada y productos cárnicos” ha sido realizado por la Graduada en Biología Dña. Cristina González-Quevedo Revuelta en AsturBiotech bajo su dirección, constituyendo el Trabajo Fin de Máster de la interesada, cuya presentación se autoriza.

Gijón, a 18... de Junio de 2019

Fdo. Dr. Alejandro Vázquez Martín

VºBº: Prof. Dr. Francisco Parra

## ÍNDICE

<b>1. Introducción</b> .....	5
<b>2. Metodología empleada</b> .....	10
• <i>Salmonella spp.</i> .....	12
• <i>Listeria monocytogenes</i> .....	14
• <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
• <i>Escherichia coli</i> .....	18
<b>3. Resultados y discusión</b> .....	19
<b>3.1. Pastelería</b> .....	19
<b>3.2. Comida preparada</b> .....	22
<b>3.3. Productos cárnicos</b> .....	25
• <b>Productos cárnicos frescos</b> .....	26
• <b>Embutidos ahumados</b> .....	28
<b>4. Conclusión</b> .....	30
<b>5. Referencias bibliográficas</b> .....	31
<b>6. Anexo</b> .....	36

## Resumen

Debido a los cambios en el estilo de vida de la población, cada vez se consume más comida fuera de casa y con ello más alimentos listos para consumir. Estos productos no necesitan ser cocinados por lo que se consumen sin ninguna acción previa para reducir la carga microbiológica que puedan tener, lo que está provocando que aumenten los brotes de enfermedades debido a la contaminación de estos alimentos. Esto sumado a la cada vez mayor preocupación que tiene tanto el consumidor en general, como la industria, por cumplir unos estándares de calidad alimentaria, son los motivos por los cuales se ha llevado a cabo este trabajo para determinar esta calidad microbiológica en tres matrices alimentarias: productos cárnicos, comida preparada y pastelería. De los 210 alimentos 44 (21 %) fueron positivos para la presencia de contaminación microbiana. En pastelería se determinó un 5 % (3 de 60) de prevalencia de contaminación de *Staphylococcus aureus* y en comida preparada un 6 % (4 de 60), por lo que no se consideran objeto de preocupación. En cuanto a los productos cárnicos, divididos en dos grupos, embutidos ahumados y productos cárnicos frescos, los primeros mostraron estar casi libres de contaminación, pero por el contrario, en los segundos se determinó una prevalencia del 60 % (36 de 60) de *Escherichia coli*. Siendo esta bacteria utilizada como marcador de higiene en los procesos, se puede concluir que con estos resultados obtenidos más que determinantes, es necesaria una revisión de las medidas de higiene y desinfección y un control más estricto con estos productos cárnicos frescos. Por otro lado se estudió también la presencia de *Salmonella spp.* en todas las matrices y ningún alimento fue positivo para el crecimiento de esta bacteria.

Palabras clave: comida preparada, contaminación bacteriana, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, pastelería, prevalencia, productos cárnicos, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*.

## Abstract

Due to changes in the lifestyle of the population, increasingly food is consumed out of home and with it more ready-to-eat foods. These products do not need to be cooked so they are consumed without any previous action to reduce the microbiological load, which is causing the increase of diseases outbreaks due to the contamination of these foods. This, added to the growing concern of both the consumer in general and the industry, to meet food quality standards, are the reasons why this work has been carried out to determine this microbiological quality in three food matrices: meat products, ready-to-eat food and pastry products. Of the 210 foods 44 (21%) were positive in the presence of microorganisms. In pastry products, 5% (3 out of 60) prevalence of *Staphylococcus aureus* contamination was determined, and 6 % in ready-to-eat food (4 out of 60), they are not considered a concern. Regarding meat products, divided into two groups, smoked sausages and fresh meat products, in the case of the former there was no cause for concern, but in contrast, in the latter a prevalence of 60 % was determined (36 of 60) of *Escherichia coli*. Being this bacterium used as a marker of hygiene in the processes, it can be concluded that with these results obtained more than determining factors, it is necessary to review the hygiene and disinfection measures and a more strict control with this matrix of meat products. On the other hand, the presence of *Salmonella spp.* was studied in all matrices and any sample was positive for the growth of this bacterium.

Keywords: bacterial contamination, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, meat products, pastry products, prevalence, ready to eat food, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*.

## 1. Introducción

Los avances en estos últimos años, en las tecnologías de procesamiento, conservación, empaquetado en diferentes atmósferas, comercialización y envío a escala global de alimentos, permiten a la industria alimentaria ofrecer a los consumidores, una amplia gama de productos frescos y cocinados de alta calidad durante todo el año, en todos los lugares del mundo. Pero algunas de esas tecnologías y prácticas también han provocado que exista un mayor riesgo de enfermedades humanas asociadas con los alimentos debido a contaminación con bacterias patógenas, mohos micotoxigénicos, virus y parásitos (Yap *et al.*, 2019). Las nuevas tendencias en la producción de alimentos, como el procesamiento mínimo, la producción en masa y la globalización, entre otros, son los principales factores y condiciones que se han introducido y que pueden aumentar la presencia y posterior crecimiento de patógenos, sobretodo bacterianos (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2012).

Por otro lado, además de los cambios en la industria alimentaria, los cambios en la demografía social y los patrones de consumo de alimentos, también han contribuido a un aumento de los brotes documentados de enfermedades humanas asociadas con la alimentación. El cambio en el estilo de vida está haciendo que el número de personas que consumen comidas fuera del hogar esté aumentando, añadiéndose a esto la modificación de sus hábitos alimentarios, lo que incluye un aumento del consumo de alimentos listos para comer, para el consumo fuera de casa o incluso en movimiento (Beuchat y Ryu, 1997).

Estos alimentos listos para comer se han vuelto muy populares en los últimos años, ya que han ampliado las opciones y expectativas de los consumidores y además son fáciles de preparar, se ahorra tiempo, existe una gran variedad de productos diferentes y tienen una vida útil prolongada. Es importante saber que estos alimentos se definen como productos listos para ser consumidos sin ninguna operación o simplemente por calentamiento, sin requerir un tratamiento efectivo para eliminar o reducir los microorganismos que puedan contener a un nivel aceptable. Este hecho es lo que está provocando una amplia gama de problemas microbiológicos emergentes en la seguridad de los alimentos (Kotzekidou, 2013).

Estos brotes y problemas de contaminación microbiológica derivados de estos productos listos para consumir se deben a su alto contenido de agua, las altas concentraciones de proteínas con nutrientes accesibles, las concentraciones de otros constituyentes solubles en agua y un pH cercano al neutro, que hacen que la mayoría de estos alimentos representen un substrato adecuado para el crecimiento bacteriano. Además, a menudo estos productos se preparan a mano, dando lugar a un problema añadido ya que este contacto directo con los manipuladores puede incrementar la incidencia de contaminación con posibles microorganismos patógenos (Beccalli *et al.*, 2018).

Se puede decir que las enfermedades transmitidas por los alimentos son una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. El informe global de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, en 2010, hubo 600 millones de casos de enfermedades transmitidas por los alimentos que causaron 420,000 muertes, de las cuales 230,000 se asociaron a enfermedades diarreicas (WHO, 2015). De acuerdo con los datos de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), el pollo es la principal causa de enfermedades asociadas a brotes transmitidos por alimentos en los Estados Unidos, siendo responsable del 23% de todos los casos reportados y, en Europa, los huevos y los productos derivados del huevo son los vehículos más importantes estos brotes (EFSA y ECDC, 2015).

Hablando de la comida preparada o lista para llevar, aunque los informes varían, se ha estimado que hasta el 95.8% de las enfermedades transmitidas por los alimentos están asociadas con alimentos preparados en establecimientos fuera del hogar, empaquetados y listos para comer, o servidos en cafeterías y establecimientos de comida (Kim *et al.*, 2018).

Aunque hasta la fecha, han sido los alimentos de origen animal la principal fuente de brotes documentados e informados de enfermedades transmitidas por los alimentos y el 90% del total de los brotes en la Unión Europea (UE) de 2007 a 2011 se asociaron con estos productos cárnicos (Söderqvist, 2017). Los principales patógenos a controlar en la industria de la carne incluyen *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. Y aunque es necesario garantizar la

inocuidad de los alimentos para la salud de los consumidores y la industria, estas bacterias patógenas y otras como *Vibrio spp.* y *Clostridium spp.*, entre otras, se detectan habitualmente también en productos de pastelería, pescado y comida preparada (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2012).

Algunas de estas bacterias pueden estar presentes en el ambiente natural, pero muchas otras ingresan en la cadena alimentaria como resultado de las malas condiciones de higiene durante el procesamiento y almacenamiento (Gutiérrez *et al.*, 2012). De los patógenos bacterianos nombrados anteriormente, la mayoría son contaminantes fecales de portadores animales o humanos, exceptuando *L. monocytogenes*, que es ubicuo en la naturaleza, incluyendo el suelo y la vegetación (Söderqvist, 2017).

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es uno de los principales agentes bacterianos que causan enfermedades transmitidas por los alimentos en los seres humanos. Es un patógeno oportunista versátil que puede causar una variedad de infecciones, desde infecciones superficiales de la piel hasta enfermedades invasivas graves o incluso fatales. Este microorganismo puede causar intoxicación alimentaria a través de la producción de enterotoxinas que permanecen activas en el tracto digestivo luego de la ingestión, ya que estas son altamente resistentes al calor, las enzimas proteolíticas y el pH bajo (Van Asselt *et al.*, 2017).

Además, este microorganismo forma biopelículas en superficies bióticas y abióticas, capacidad que se reconoce cada vez más como una de sus propiedades importantes de virulencia. Esta cualidad permite que *S. aureus* sobreviva en todo tipo de entornos hostiles, ya que las células dentro de la biopelícula son muy resistentes a los procedimientos de saneamiento y a los agentes antimicrobianos. Esto provoca un problema grave en muchos sectores de la industria, ya que hace que las superficies de procesamiento de alimentos sean una fuente importante de contaminación cruzada de alimentos, además de los seres humanos, que son portadores asintomáticos comunes de *S. aureus* en nariz, garganta y piel (Gutiérrez *et al.*, 2012).

*Listeria monocytogenes* es un patógeno, facultativo intracelular y oportunista que puede causar enfermedades graves en individuos inmunodeprimidos (mujeres embarazadas, pacientes con cáncer y SIDA, receptores de trasplantes de órganos y adultos mayores de

65 años). Esta bacteria provoca una preocupación importante debido a su ubicuidad, capacidad para crecer a bajas temperaturas soportando incluso la refrigeración, su resistencia a un amplio rango de pH (4,4 a 9,6) y su gran osmotolerancia. Además, es otro ejemplo de microorganismo que tiene la facultad de adherirse a las superficies formando biopelículas, propiedad que le permite protegerse de la acción de los tratamientos antimicrobianos (Kotzekidou, 2013).

Los centros de control y prevención de enfermedades (CDC) reportan 20 muertes por cada 100 casos de listeriosis por año y consideran esta enfermedad como un importante problema de salud pública. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) informó sobre más de 2,500 casos humanos de listeriosis, 962 casos de hospitalización y 247 muertes, colocando a este patógeno en el quinto lugar por número de casos transmitidos por los alimentos, pero en primer lugar en tasas de hospitalización (97,7%) y mortalidad (16,2%) (Beccalli *et al.*, 2018).

*Escherichia coli* es una bacteria de la flora microbiana común que se encuentra en el tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente, desempeñando un importante papel dentro de la fisiología del intestino. Generalmente, este microorganismo suele ser inocuo, pero algunas cepas son causantes de gastroenteritis y otras enfermedades, como la *Escherichia coli* O157: H7 enterohemorrágica que se asocia predominantemente con la colitis hemorrágica (Uddin *et al.*, 2019).

Los análisis de *E. coli* son el foco de la mayoría de los estudios de seguridad alimentaria realizados para la industria, ya que su presencia o ausencia se interpreta como un indicador del estado higiénico de los alimentos debido a que se suele asociar a esta bacteria con la contaminación fecal o condiciones de manipulación insalubres (Scheinberg *et al.*, 2017). El consumo de alimentos derivados de animales contaminados con esta bacteria es la principal ruta de transmisión, especialmente debido a comer carne cruda o poco cocinada procedente de vaca, cordero, cerdo, pollo y carne de caza silvestre (Nobili *et al.*, 2017).

Por último, la *Salmonella spp.* es un patógeno zoonótico presente en el tracto intestinal de una amplia gama de animales domésticos y silvestres que puede como consecuencia de la contaminación directa o indirecta, llegar hasta diversos alimentos tanto de origen



animal como vegetal. La mayoría de los casos de salmonelosis humana se deben al consumo de aves de corral, cerdo, ternera, productos lácteos, huevos y mariscos contaminados (Uddin *et al.*, 2019).

La salmonelosis es la causa más frecuentemente registrada de gastroenteritis bacteriana humana y la segunda zoonosis más notificada en la Unión Europea (UE), después de la campilobacteriosis (Mughini-gras *et al.*, 2014). Aunque se ha observado una tendencia a la disminución significativa de la salmonelosis entre 2008 y 2016, en 2016, se informaron todavía 94.530 casos confirmados de salmonelosis humana en la Unión Europea (EFSA y ECDC, 2018).

Por todo ello, todas las empresas alimentarias de la UE deben garantizar que sus productos alimenticios son seguros y que cumplen con los criterios de seguridad alimentaria durante toda su vida útil en condiciones razonablemente previsibles de distribución, almacenamiento y uso. Pero la contaminación de los alimentos con patógenos bacterianos puede ocurrir durante cualquier paso en la cadena de producción (Söderqvist, 2017).

En los productos cárnicos, la posible contaminación puede venir del propio animal, el entorno en el que vive y se reproduce, el lugar de sacrificio, el procesamiento de las canales con la entrada del cuchillo a través de la piel y/o la fabricación de preparaciones de carne debido a prácticas de higiene deficientes, tecnologías obsoletas y una organización y distribución deficientes del matadero (Silva *et al.*, 2018).

En cuanto a los alimentos listos para consumir o comida preparada y pastelería, las malas prácticas de higiene en las plantas o lugares de procesamiento de alimentos pueden ser los causantes de la contaminación con patógenos (Gutiérrez *et al.*, 2012). La transferencia de microorganismos de las manos de los manipuladores a los alimentos debido a un lavado inadecuado sigue siendo un factor importante en la propagación de enfermedades transmitidas por los alimentos. Las autoridades de seguridad alimentaria de todo el mundo generalmente no permiten que los manipuladores de alimentos trabajen con las manos descubiertas, y requieren el uso de utensilios como espátulas o pinzas, cambiándolos entre tareas. Además, las manos deben lavarse antes de manipular los alimentos, durante la preparación de los alimentos, entre el manejo de

los alimentos crudos y los cocinados, y entre las tareas. Otro factor a tener en cuenta es que puede existir contaminación cruzada, que ocurre cuando estos alimentos se manejan después del contacto con otros alimentos, superficies, manos y guantes contaminados o cuando los alimentos crudos y cocinados se manejan juntos (Yap *et al.*, 2019).

No es de extrañar que debido a todo lo anterior, en las últimas décadas, la seguridad alimentaria y el control de calidad en todos los procesos de producción hayan atraído cada vez más atención. El cumplimiento de los criterios de calidad estándar se ha convertido en un paso fundamental en la agenda de las empresas e instituciones internacionales, desde la práctica clínica habitual hasta los productos de la industria alimentaria, con el objetivo de garantizar estándares de alta calidad para los consumidores finales, que cada vez están más demandados tanto por los propios consumidores como por la legislación (D'Alessandro y Zolla, 2012).

Ya sabemos entonces que existe una creciente preocupación por las enfermedades asociadas con la contaminación microbiana de los alimentos y por ello, los estándares de calidad que debe cumplir la industria alimentaria son cada vez más estrictos. Principales razones por las que en este trabajo se pretende estudiar tres de las matrices de alimentos que más problemas provocan a la industria alimentaria, la comida preparada, la pastelería y los productos cárnicos. El objetivo es conocer así el porcentaje de alimentos que pueden llegar contaminados a nuestras casas y por lo tanto, si se están cumpliendo o no, los estándares de calidad alimentaria. Para ello, se han seleccionado y recogido aleatoriamente diferentes lotes de diversos alimentos y se han procesado en el laboratorio, con el fin de determinar la presencia o ausencia de las bacterias que la legislación obliga a controlar en cada matriz de alimentos anteriormente mencionada.

## **2. Metodología empleada**

El objetivo de este trabajo es, por lo tanto, determinar la seguridad alimentaria de tres matrices de alimentos diferentes según su carga microbiológica. Para ello, se cultivan diferentes diluciones de estos alimentos en los medios específicos para cada microorganismo que considera la legislación que es de importancia controlar en cada

matriz. Toda la metodología seguida en el proceso de análisis y preparación de cada muestra está validada según norma ISO 16140 y las diferentes pruebas a realizar y criterios para considerar si es óptimo o no el estado microbiológico del alimento, se basan en el documento de referencia de microbiología de alimentos, el reglamento (CE) n° 1441/2007 de la Comisión Europea.

Tabla 1. Representación de los microorganismos y criterios microbiológicos a seguir en los análisis de cada matriz de alimentos según el reglamento Europeo. Se muestra en cada caso el límite de unidades formadoras de colonias (ufc) que entra dentro de los baremos de la normativa.

<b>Matriz alimentaria</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	<b><i>Salmonella spp.</i></b>
<b>Pastelería</b>	Ausencia en 0.1 g			Ausencia en 25 g
<b>Comida preparada</b>	< 10 ufc / g			Ausencia en 25 g
<b>Productos cárnicos frescos</b>		< 50 ufc / g		Ausencia en 25 g
<b>Embutidos ahumados</b>			Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g

Como se puede ver en la tabla superior (Tabla 1), cada matriz de alimentos diferente exige un control de microorganismos distinto. Así, la matriz alimentaria de pastelería debe estar libre de *Salmonella spp.* y *S. aureus*, y la comida lista para llevar o comida preparada debe estar libre también de *Salmonella spp.*, aunque en el caso de *S. aureus* es aceptable que haya hasta 10 unidades formadoras de colonias por gramo. En el caso de los productos cárnicos, divididos a su vez en dos grupos, productos cárnicos frescos y embutidos ahumados, los microorganismos que se controlan son *Salmonella spp.* y *E. coli* y *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes*, respectivamente.

Independientemente del tipo de muestra, matriz a la que pertenezca el alimento o prueba que se le vaya a realizar, el primer paso a realizar en el laboratorio es identificar la muestra con un número de prueba y apuntar la fecha de entrada del alimento. Si el análisis no se va a realizar de manera inmediata, la muestra se almacenará en las condiciones de refrigeración adecuadas hasta su procesamiento. Si no es así, para comenzar el análisis se debe proceder a la homogeneización del alimento y la realización de diluciones seriadas en el caso de que se precise. Para ello, se pesa la cantidad de alimento indicada en cada caso en la legislación (10 gramos en este caso) y se introduce

en una bolsa estéril con el número de identificación de la muestra, realizando así una dilución 1/10 con 90 ml de agua peptonada (medio BPW). Para finalizar, se coloca la muestra en el homogeneizador de muestras (Stomacher) para obtener una dilución homogénea del alimento. Los pasos a seguir a partir de aquí varían en función del microorganismo a analizar, por lo que a continuación se detalla el proceso a seguir en cada uno de los análisis una vez se tiene la dilución homogénea del alimento:

- *Salmonella spp.*

Método validado según norma ISO 6579 para la detección de esta bacteria en análisis de productos alimenticios para consumo humano y animal. En este caso la muestra de alimento diluida se enriquece previamente a la siembra en placa de la misma, para así fomentar el crecimiento de las posibles bacterias de *Salmonella* que haya en el alimento. Para ello se añaden 400 µl de la solución de enriquecimiento a la bolsa de la dilución del alimento y se introduce en el incubador a 41 grados durante 18 horas.



Figura 1. Esquema explicativo sobre los pasos a seguir en el análisis de las muestras de alimento para determinación de *Salmonella spp.*

Como se puede ver en el esquema (Figura 1), una vez pasado este tiempo de enriquecimiento se procede a la siembra en superficie de 100  $\mu$ l de la dilución 1/10 de la muestra del alimento enriquecida en una placa de cultivo. Para ello se preparan placas con agar RAPID Salmonella, que es un medio cromógeno que hace que las colonias de *Salmonella* crezcan en color magenta, mientras las colonias de otros microorganismos crecen en color azul o sin color. Esto se debe a la detección de la actividad de la esterasa-C8 y la  $\beta$ -glucosidasa que permiten diferenciar *Salmonella* de otras enterobacterias. Una vez sembrado en placa se deja crecer en el incubador a 37°C durante 24 horas.

Llegados a este punto, sabemos que las colonias magentas son susceptibles de ser *Salmonella spp.*, pero todo positivo en placa de esta bacteria debe ser confirmado posteriormente por otros métodos. Por lo tanto, a las colonias que presenten este color, (Figura 2 Imagen A), se les hace una prueba confirmativa que se denomina Salmonella Látex, en la cual sobre una plantilla especial, se inocula una colonia presuntiva de ser esta bacteria en una gota de látex (Figura 2 Imagen B). Si el medio, es decir el látex, se aglutina es que la prueba es positiva y por lo tanto la colonia inoculada es de *Salmonella spp.*

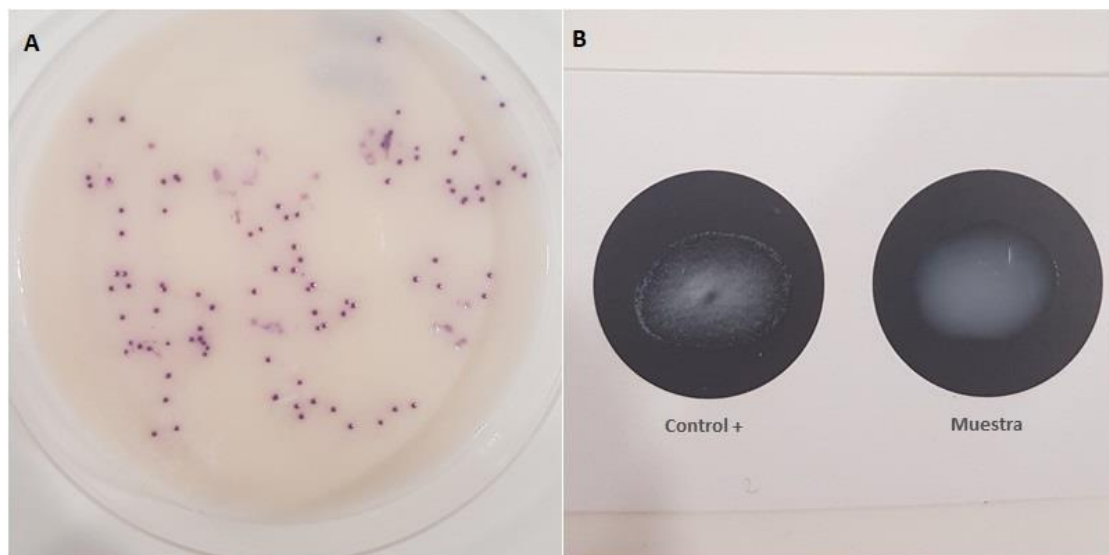


Figura 2. Imagen A- Crecimiento de colonias susceptibles de ser *Salmonella spp.* por su color magenta. Imagen B- Prueba confirmativa Salmonella Látex, a la izquierda se observa el control positivo con aglutinación y a la derecha el análisis de una colonia que es negativa para *Salmonella*.

- *Listeria monocytogenes*

Método validado según norma ISO 11290. En este caso se utiliza el agar COMPASS Listeria. Su funcionamiento se basa en la presencia en el medio de X-β-glucósido (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-glucopiranosido), el cual *Listeria* hidroliza dando lugar a un precipitado azul en el centro de las colonias. Además, este medio contiene L-α-fosfatidilinositol, que en este caso *Listeria monocytogenes*, gracias a la enzima fosfolipasa C que es uno de sus factores de virulencia característicos, degrada este sustrato formando un halo opaco característico alrededor de la colonia.



Figura 3. Esquema explicativo sobre los pasos a seguir en el análisis de las muestras de alimento para determinación de *Listeria monocytogenes*.

En este análisis (Figura 3) a diferencia del caso de la *Salmonella*, no es necesario añadir previamente ningún suplemento de enriquecimiento a la dilución de la muestra antes de sembrarla, ya que el propio medio de cultivo contiene, por un lado, un suplemento selectivo que inhibe el crecimiento de otros microorganismos y por otro un complemento de enriquecimiento específico para *Listeria*. Por lo que una vez que se obtiene la dilución 1/10 del alimento, se siembran en la placa 100 µl en superficie, se extiende homogéneamente y se introduce en el incubador a 37°C durante 48 horas. En

las primeras 24 horas, si hay contaminación del alimento con *Listeria* ya se puede observar crecimiento de colonias, pero se mantiene otras 24 para confirmar o descartar con seguridad la presencia de esta bacteria.

Como en el caso anterior, si crecen colonias en la placa, en este caso de color azul y con un halo a su alrededor (Figura 4 Imagen A), debe hacerse una prueba confirmativa para saber con certeza si se trata de colonias de *Listeria monocytogenes*. Esto se debe a que otras especies de *Listeria* pueden crecer formando colonias azules verdosas pero sin halo o incluso, en el caso de *Listeria ivanovii*, esta puede crecer formando colonias azules pero con un halo más pequeño, lo que puede llevar a un diagnóstico equivocado cuando se observa el crecimiento en placa. Esta prueba confirmativa se realiza con un caldo o medio líquido que permite la diferenciación debido a la acidificación de la ramnosa por la cepa patógena de *L. monocytogenes*, ya que esto no ocurre con cepas no patógenas como *L. ivanovii*. Para ello, se coge una colonia presuntiva de la placa y se inocula en el caldo dejándose incubar durante 6 horas a 37°C. Si el color del medio líquido cambia de color púrpura a amarillo (Figura 4 Imagen B), se debe al indicador de pH que contiene el medio, muestra que ha caído el pH por la acidificación provocada por la fermentación de la ramnosa, por lo tanto, se confirma que la colonia es *L. monocytogenes* y no otras.

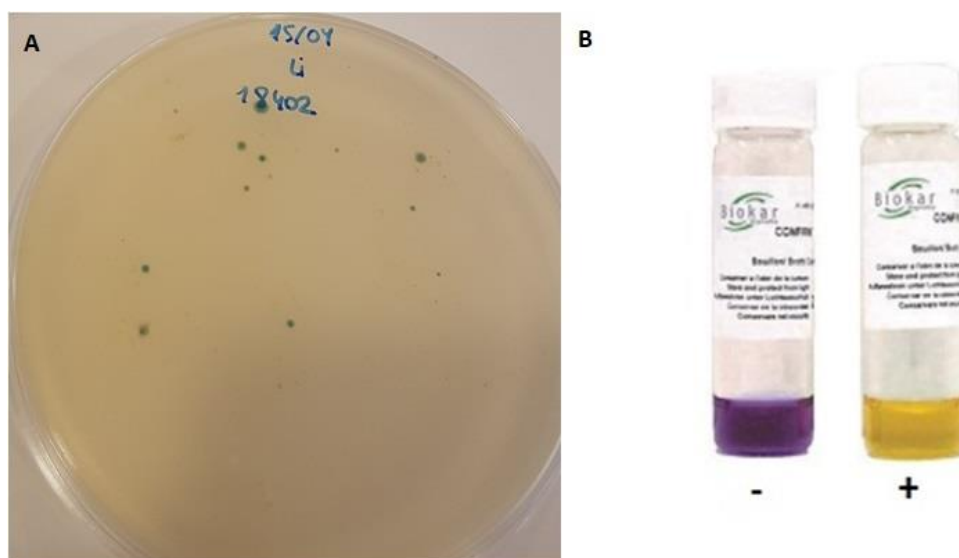


Figura 4. Imagen A- Crecimiento de colonias susceptibles de ser *Listeria monocytogenes* por su color azul y el crecimiento de un halo a su alrededor que en la imagen no se puede observar. Imagen B- Prueba confirmativa de *Listeria monocytogenes* en medio líquido, a la izquierda se observa el color púrpura original del medio y a la derecha el cambio a color amarillo debido a que la prueba es positiva.

- *Staphylococcus aureus*

Método validado según norma ISO 6888. El medio que se utiliza en este caso es el Agar Baird Parker con plasma de conejo con fibrinógeno. Este medio contiene plasma con fibrinógeno porque se pretende diferenciar las colonias que crezcan en la placa gracias a la principal característica de *S. aureus*, la producción de coagulasa libre y por lo tanto, su capacidad de coagulación. Es decir, si al crecer las colonias forman un halo de fibrina a su alrededor, son coagulasa positivas y por ende, son *S. aureus*. Además, el medio contiene telurito potásico para la inhibición del crecimiento de microorganismos gram positivos contaminantes, compuesto que por otra parte da una coloración negra a las colonias de *S. aureus* debido a la reducción que realiza la bacteria del telurito a telurio.



Figura 5. Esquema explicativo sobre los pasos a seguir en el análisis de las muestras de alimento para determinación de *Staphylococcus aureus*.

Como se puede observar en el esquema (Figura 5), para el análisis de esta bacteria es necesario realizar una segunda dilución antes de la siembra en placa, ya que se analizan dos diluciones del alimento diferentes 1/10 y 1/100. Por lo tanto, para comenzar se añade 1 ml de la dilución 1/10 en un tubo estéril con 9 ml de agua peptonada para realizar la segunda dilución. Una vez que se tienen ambas diluciones, se coloca 1 ml de



la 1/10 en una placa Petri vacía rotulada con esa dilución y 1 ml de la 1/100 en otra placa rotulada como tal. Esto es así porque la siembra de estos alimentos se hace en profundidad, es decir, que una vez sembrada en la placa la muestra a analizar, sobre ella se añaden unos 10-15 ml del medio y se homogeniza todo dando vueltas para una distribución homogénea del alimento, se deja solidificar y por último, se introduce en el incubador a 37 grados durante 48 horas.

Como en los casos anteriores, las colonias presuntivas de ser esta bacteria que crezcan en la placa han de ser confirmadas, ya que hay casos en los que reconocer el halo de fibrina es complicado o incluso algunas colonias que parecen tener halo pero no es debido a la coagulación. Por lo tanto, se realiza una prueba confirmativa (Figura 6 Imagen B) que se basa también en la capacidad de coagulación de *S. aureus*. Para ello se añaden 100 µl de plasma bovino en un eppendorf o tubo estéril y se inocula una de las colonias que se quieren confirmar, si pasadas dos horas el plasma está coagulado, se considera un positivo en *Staphylococcus aureus*.

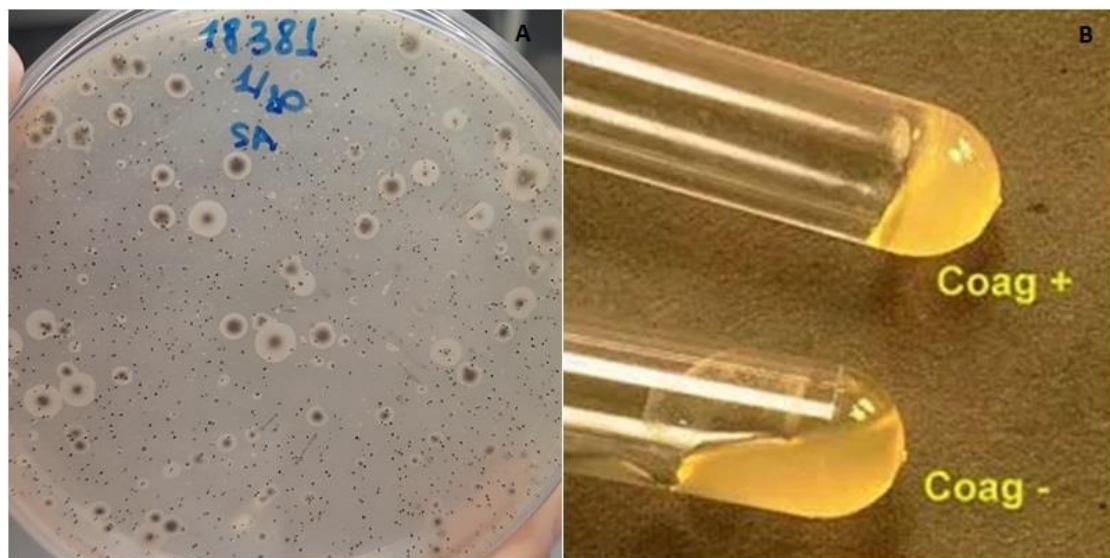


Figura 6. Imagen A- Crecimiento de colonias susceptibles de ser *Staphylococcus aureus* por su color negro y el crecimiento de un claro halo a su alrededor. Imagen B- Prueba confirmativa de la coagulasa, en la que si la colonia coagula el plasma como en el tubo superior de la imagen, la prueba es positiva.

- *Escherichia coli*

Método validado según norma ISO 16649. En este análisis se utiliza el agar TBX, que es un medio selectivo para el recuento de esta bacteria  $\beta$ -D-glucoronidasa positiva en los productos alimenticios. Esta enzima está presente también en otras bacterias, pero solo en un número escaso de cepas, en cambio en el caso de *E. coli* se ha demostrado que más de un 97% de las bacterias de esta especie lo poseen. Este medio contiene sales biliares para inhibir el crecimiento de las bacterias gram positivas y BCIG (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucorónico) que es un sustrato cromógeno que al metabolizarse por la  $\beta$ -D-glucoronidasa da color azul a las colonias.



Figura 7. Esquema explicativo sobre los pasos a seguir en el análisis de las muestras de alimento para determinación de *Escherichia coli*.

Como se puede observar en el esquema (Figura 7), para llevar a cabo este análisis de *E. coli* en productos alimenticios, a diferencia de los casos anteriores, es necesario realizar tres diluciones. Por lo tanto, una vez que se obtiene la bolsa del Stomacher con la dilución 1/10 es necesario transferir 1 ml a un tubo con 9 ml de agua peptonada, obteniendo así la dilución 1/100, y después, de esta última dilución transferir otro ml a otro tubo estéril con 9 ml de agua peptonada para obtener así la tercera dilución, la 1/1000. En este caso, al igual que en *S. aureus*, la siembra se realiza en profundidad, por

lo que como en el caso anterior se transfiere 1 ml de la muestra a una placa de Petri, a continuación se añaden 15 ml de medio y se mezcla bien para que el alimento se distribuya homogéneamente. Estas placas se incuban a 41 grados durante 24 horas y pasado este tiempo se cuentan las colonias azules que hayan crecido en cada placa (Figura 8), en este análisis no se considera necesaria una prueba confirmativa.



Figura 8. Placas de cultivo con medio TBX en las que se observa en color azul el crecimiento de *Escherichia coli* con una concentración decreciente de colonias desde la dilución 1/10 hasta la 1/1000.

### 3. Resultados y discusión

Durante el estudio, los resultados se van agrupando en una tabla por cada matriz (estas se pueden observar en el anexo), para su posterior análisis y realización de gráficas para una mejor interpretación de los datos obtenidos. A continuación, se detallan estos resultados separados por matrices y se comparan los datos obtenidos con otros estudios y estadísticas encontrados en varias fuentes bibliográficas.

#### 3.1. Pastelería

En 2017, se identificó *Salmonella spp.* como causante de 1.241 brotes provocados por los alimentos, afectando a 9.600 personas en 25 países Europeos, según reporta la EFSA. Solamente en España se notificaron 1.326 casos de Salmonelosis provocada por alimentos, pertenecientes a 171 brotes diferentes. Además, esta bacteria es el agente más frecuentemente detectado en brotes debido a los alimentos, en 2017 el 24.4 % del número total de brotes fueron causados por esta misma. En cuanto a la comida que provoca estos problemas, el huevo y sus productos siguen siendo el principal causante siendo los responsables del 36.8 % del total de los brotes, el segundo lugar lo tienen los

productos cárnicos con un 16.8% y el tercero, la pastelería con un 16.7%. En un estudio realizado por autoridades competentes de cada país Europeo se analizaron una serie de alimentos diferentes, concretamente en España se recogieron 2.746 muestras de las cuales 176 (6.41 %) indicaron presencia de *Salmonella* (EFSA and ECDC, 2018).

Además, hay estudios ajenos a las autoridades Europeas que apoyan estos datos de contaminación alimentaria por *Salmonella spp.* En uno de ellos, la mahonesa casera (con huevo) fue el vehículo más frecuentemente identificado (17.39%), seguido por la pastelería (15.94%) y los productos cárnicos (12.32%), coincidiendo con lo expuesto anteriormente (Capalonga *et al.*, 2014).

Sin embargo, en ninguna de las tres matrices alimentarias diferentes analizadas en este trabajo se ha encontrado ningún positivo en *Salmonella spp.*, las 210 muestras analizadas han sido negativas para esta bacteria. En este caso concreto de pastelería, siendo de los productos más frecuentemente contaminados con *Salmonella* debido sobre todo a las cremas pasteleras realizadas con huevo, llama la atención, pero se pueden observar los resultados (Figura 9).

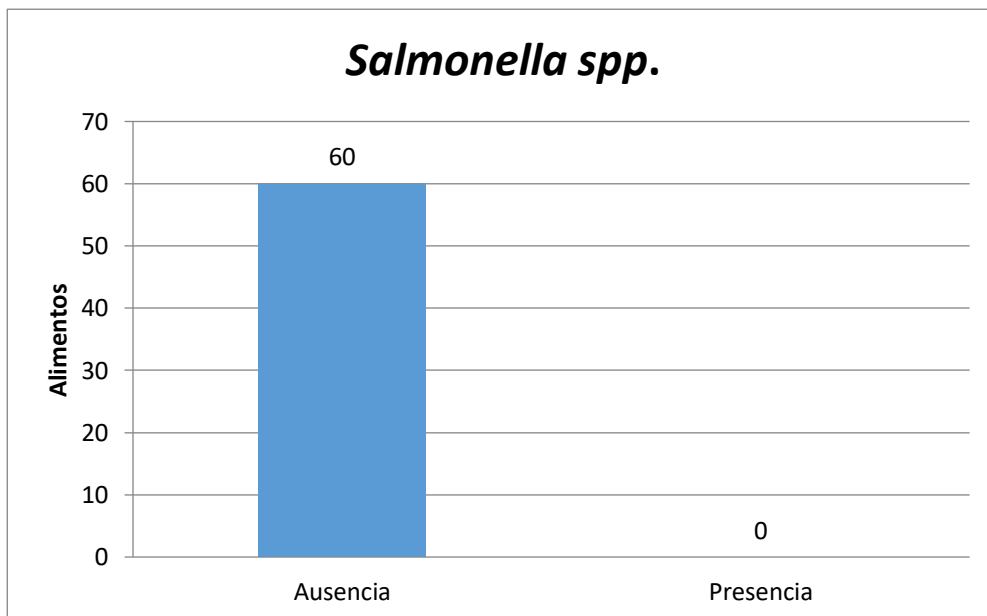


Figura 9. Resultados obtenidos sobre la presencia o ausencia de *Salmonella spp.* en las diferentes muestras de pastelería analizadas.

En cuanto a la presencia de *Staphylococcus aureus* en estas mismas muestras de pastelería, los datos cambian, ya que en este caso sí que se detectaron en 3 de las 60 muestras la presencia de esta bacteria (Figura 10). Estas eran un torpedo de crema, una milhojas de crema y merengue y un canutillo de crema, por lo que podría suponerse que el causante sea la crema pastelera sabiendo además las estadísticas de contaminación ya mencionadas de este producto.

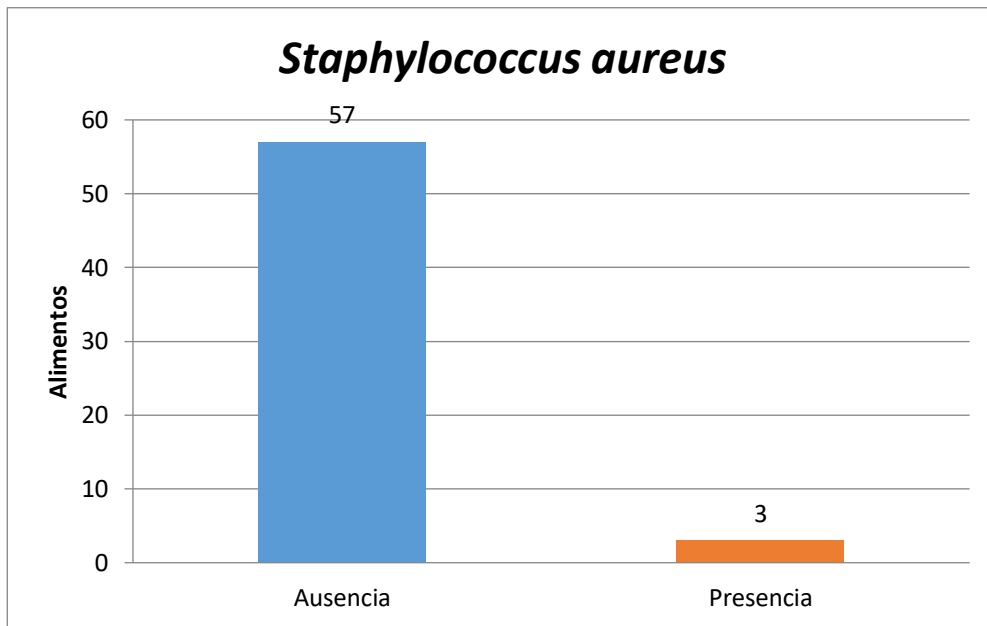


Figura 10. Resultados obtenidos en los análisis de productos de pastelería para la detección de la presencia de contaminación por *Staphylococcus aureus*.

Otros grupos de investigación han llevado a cabo estudios separando estos productos en diferentes categorías, así no encontraron ningún positivo de los 66 pasteles horneados que analizaron, 2 de 16 (12.5 %) en pastelería con crema pastelera y 4 de 46 (8.7 %) en pastelería congelada lista para hornear (Kotzekidou, 2013).

Además, ya en estudios de hace unos años analizaron la presencia de este microorganismo en productos de panadería y pastelería, y *S. aureus* fue aislado de 21 (9.8 %) de las 214 muestras analizadas. El producto del que más veces se aisló fue los profiteroles, pastelería rellena de crema, 12 de 40 (30 %) fueron positivos, dato que junto a los anteriores apoya lo ya mencionado sobre la pastelería y la crema pastelera (Sumner *et al.*, 1993).

Como se puede observar, estos tres pasteles positivos hacen que se determine la prevalencia de *S. aureus* en el 5 % del total de las muestras analizadas en esta matriz (Figura 11). En otro estudio de presencia de esta bacteria en productos vendidos en el norte de Italia, con un total de 11.384 muestras analizadas, examinaron 173 pasteles, de los cuales seis (3.5%) reflejaron presencia de *S. aureus* (Normanno *et al.*, 2005). Por lo que el porcentaje de productos de pastelería contaminados obtenido en este trabajo y las causas que han podido originar esta contaminación se encuentran apoyados por bibliografía ya citada.

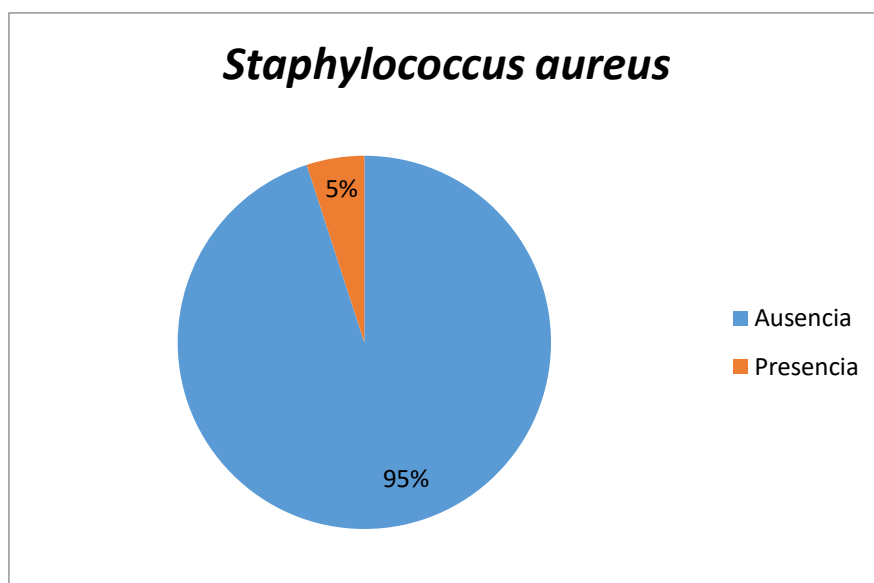


Figura 11. Porcentajes obtenidos de productos de pastelería con presencia de *S. aureus* frente a pasteles con ausencia del mismo tras la realización de los análisis pertinentes.

### 3.2. Comida preparada

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, en ninguna de las matrices se detectó *Salmonella spp.*, a pesar de que en extensa bibliografía se detallan la cantidad de brotes y problemas que provoca esta bacteria. Al contrario que en el caso de la carne o la pastelería, en la comida preparada este microorganismo no suele ser causante de grandes problemas, tampoco demostró serlo en este presente trabajo (Figura 12). En un estudio en el que se analizaron 27.172 muestras de comida preparada solo en el 0.2% de los casos se detectó la presencia de *Salmonella* (EFSA and ECDC, 2018).

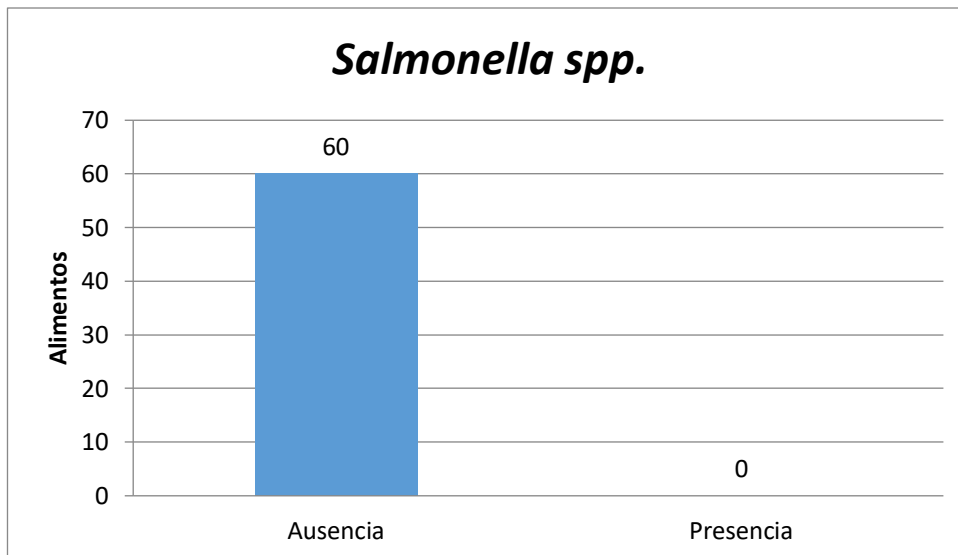


Figura 12. Resultados obtenidos a partir del análisis de alimentos listos para comer o comida preparada. En la gráfica se observan la cantidad de muestras en las que se detectó presencia de *Salmonella spp.* y las que estaban libres de ella.

Como se puede observar, en el caso de la gráfica de presencia de *Staphylococcus aureus* (Figura 13) perteneciente a la comida preparada, los datos no se separan en dos columnas, presencia y ausencia, si no que se separan en tres; ausencia, menos de 10 unidades formadoras de colonias y más de 10 ufc. Esto se debe a que en los casos anteriores el reglamento no permite que haya aislamiento de esas bacterias a partir de esos alimentos, pero en este caso entra dentro de la normativa que el alimento se catalogue como satisfactorio cuando se observan hasta 10 ufc en la placa. Si por el contrario se observan más de 10 ufc que es  $m$  (valor umbral del número de bacterias), se debe repetir el análisis sembrando esta vez cinco muestras de ese mismo alimento. Si de esas cinco muestras un máximo de dos están entre los valores  $m$  (10 ufc) y  $M$  que es el valor límite (100 ufc) y el resto están por debajo de  $m$ , el alimento se catalogará como aceptable. Si por el contrario, de ese  $n=5$  una de las muestras está por encima de  $M$  (100 ufc) o más de dos están entre  $m$  y  $M$ , el alimento se catalogará como insatisfactorio.

En el caso de este estudio solo se ha analizado una muestra de cada alimento y se ha clasificado en función del resultado obtenido en el mismo. De los 60 alimentos de comida preparada analizados en cuatro se detectó presencia de esta bacteria (Figura 13), dos de ellas serían consideradas por el reglamento como satisfactorias y las otras

dos como aceptables. Las dos primeras, las catalogadas como satisfactorias con menos de 10 ufc son un cachopo de pollo y un puré variado, las otras dos, con una carga superior a 10 ufc, son un relleno de marisco y un salpicón de marisco, con 40 y 65 ufc respectivamente. No se ha encontrado ningún alimento clasificado como insatisfactorio con más de 100 ufc.

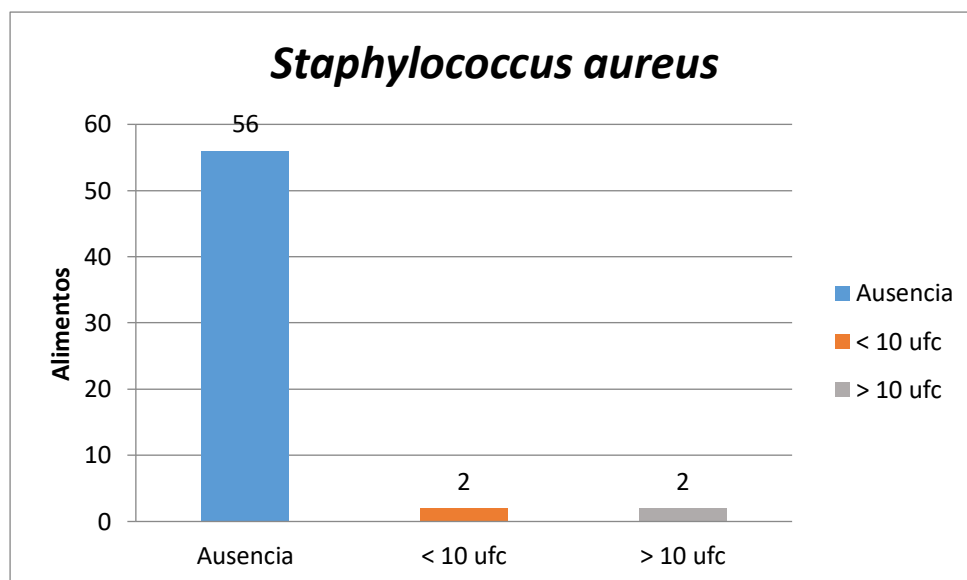


Figura 13. Resultados obtenidos de presencia de *S. aureus* tras el análisis de las muestras de comida preparada. El gráfico se separa en tres columnas según los criterios del reglamento Europeo.

La suma de estas cuatro muestras positivas revela que el 6 % del total de la comida preparada analizada tiene presencia de *Staphylococcus aureus* (Figura 14). En un estudio realizado en el servicio de restauración de varios hospitales diferentes, de 47 muestras de un total de 457, es decir en el 10.28 % de la comida preparada o lista para consumir, se aisló esta bacteria. La prevalencia en comida cocinada de origen animal fue 12 de 113 (10.61 %) y de la comida de origen no animal 15 de 269 (5.57 %) (Safarpour Dehkordi *et al.*, 2018).

Cambiando de lugar pero no de tipo de alimento, en un estudio realizado en 44 cafeterías y catering de aeropuertos se estudió la posible contaminación con *S. aureus* de la comida allí mismo preparada. Se analizaron 266 alimentos cocinados para el consumo al instante como la pasta, pizza, hamburguesas... de los cuales 6, un 2,3 % de ellos presentaron esta bacteria. Por otra parte, otro grupo de alimentos analizado fue la comida preparada que requiere un mínimo manejo, como la carne asada, de los cuales



13 de 229, 5.7 % fueron positivos también. Como último grupo, la comida cocinada lista para comer con varios ingredientes mezclados fue la que mayor prevalencia mostró, con 16 de 213, un 7.5 % (Balzaretti and Marzano, 2013). Como se puede observar, los datos expuestos de ambos estudios no parecen discernir mucho de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

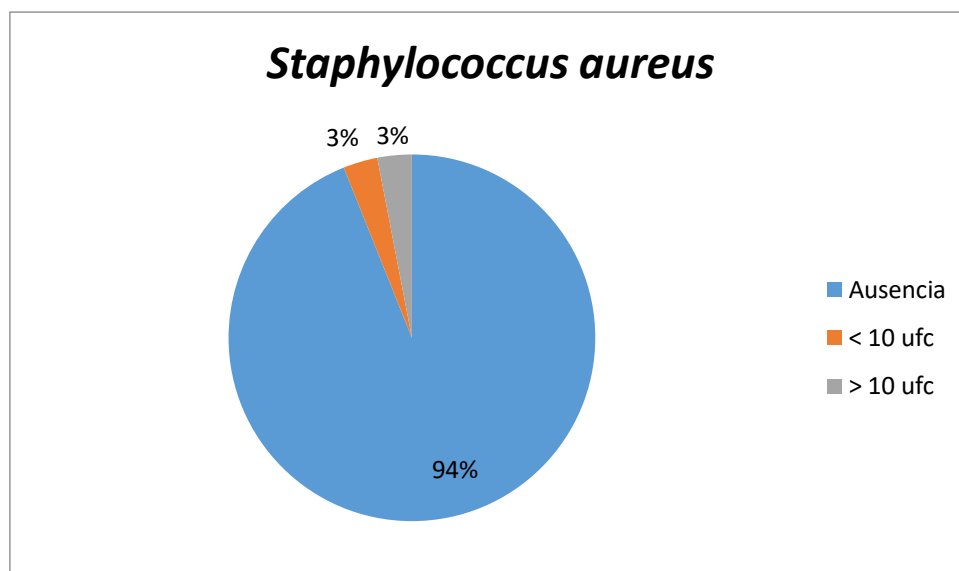


Figura 14. Porcentajes obtenidos del análisis de las muestras de comida preparada. Muestras ausentes de *Staphylococcus aureus* (azul), muestras satisfactorias (naranja) y muestras aceptables (gris).

### 3.3. Productos cárnicos

Como ya se ha escrito desde el primer apartado de estos resultados, en ninguna de las tres matrices se encontró ningún alimento con presencia de *Salmonella spp.* Siendo la pastelería y los productos cárnicos parte importante de los alimentos causantes de brotes por esta bacteria es algo que refleja que al menos en estos establecimientos se están haciendo las cosas bien.

Ya que además de los ya citados datos estadísticos de la EFSA, otros estudios han revelado prevalencia de esta bacteria en productos cárnicos. En Italia, en un muestreo de 150 productos analizados 25 fueron positivos para *Salmonella spp.*, revelando una prevalencia de 16.7 % (Piras *et al.*, 2019).

Aunque también hay ejemplos en los cuales los resultados muestran un porcentaje de contaminación menor, como es el caso de un muestreo de productos cárnicos llevado a cabo con productos recogidos directamente de las fábricas. De un total de 100 muestras de carne, 4 fueron positivas, un 4% (Osman *et al.*, 2018). Sin embargo, se observan los datos de total ausencia de esta bacteria obtenidos en el presente trabajo (Figura 15), en la cual se agrupan los resultados de los productos cárnicos frescos y los embutidos ahumados, ambos pertenecientes a la matriz de productos cárnicos.

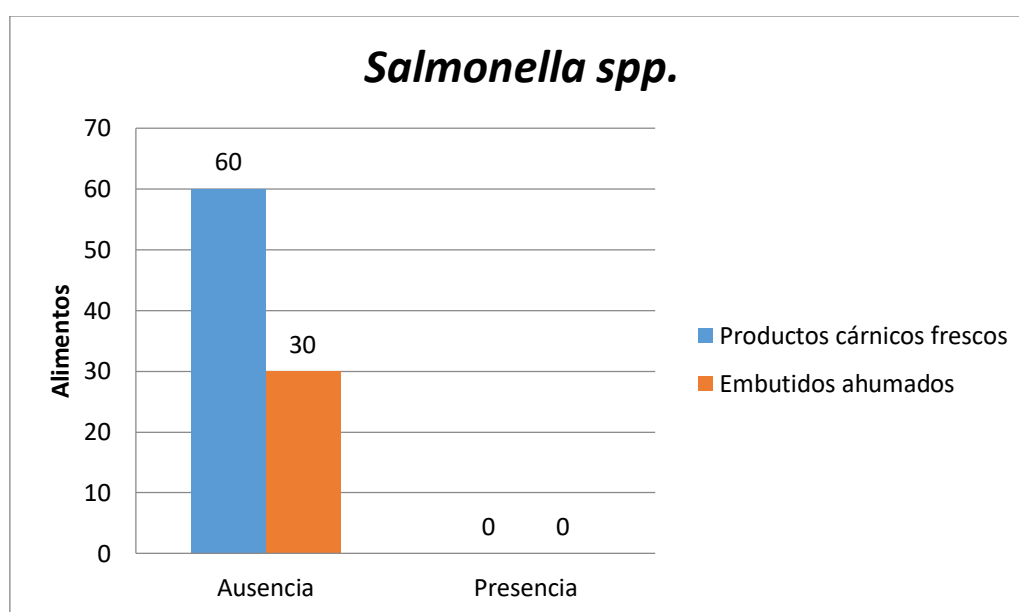


Figura 15. Resultados obtenidos a partir de los análisis de productos cárnicos para determinar la presencia de *Salmonella spp.* Se agrupan las muestras de productos cárnicos frescos y embutidos ahumados.

- **Productos cárnicos frescos**

Se puede observar (Figura 16) que como en el caso de la comida preparada, en esta gráfica de presencia de *Escherichia coli* en productos cárnicos frescos los datos no se separan en dos columnas, presencia y ausencia, si no que se separan en tres; ausencia, menos de 50 unidades formadoras de colonias y más de 50 ufc. Esto se debe a que en este caso entra dentro de la normativa que si se observa el crecimiento de menos de 50 ufc en la placa, el estado del alimento se sigue catalogando como satisfactorio. Si por el contrario se observan más de 50 ufc que es *m* (valor umbral del número de bacterias), se debe repetir el análisis sembrando esta vez cinco muestras del mismo alimento. Si de esas cinco muestras un máximo de dos están entre los valores *m* (50 ufc) y *M* que es el valor límite (500 ufc) y el resto están por debajo de *m*, el alimento se catalogará como

aceptable. Si por el contrario, de ese  $n= 5$  una de las muestras está por encima de M (500 ufc) o más de dos están entre m y M, el alimento se catalogará como insatisfactorio.

En esta matriz podemos decir que los datos no son muy optimistas, se encontraron más alimentos con presencia de *E. coli* que con ausencia, 36 y 24 respectivamente. De los que más frecuentemente se aisló esta bacteria son las hamburguesas tanto de ternera como de pollo y el picadillo. Esto se puede deber en primer lugar a la manipulación y mezcla de la carne en el primer caso y a la evisceración y posterior contaminación con bacterias fecales en el segundo. Los 8 alimentos con carga mayor a la del umbral del número de bacterias, más de 50 ufc, son 2 albóndigas de ternera y cerdo (que tienen el mismo proceso de manipulación que las hamburguesas), 3 hamburguesas de vacuno, 1 hamburguesa de pollo y 2 picadillo de chorizo cuyos valores de unidades formadoras de colonias se encuentran muy por encima de los datos permitidos por el reglamento,  $7,5 \times 10^3$  y  $6,6 \times 10^2$ , que se catalogarían como insatisfactorios.

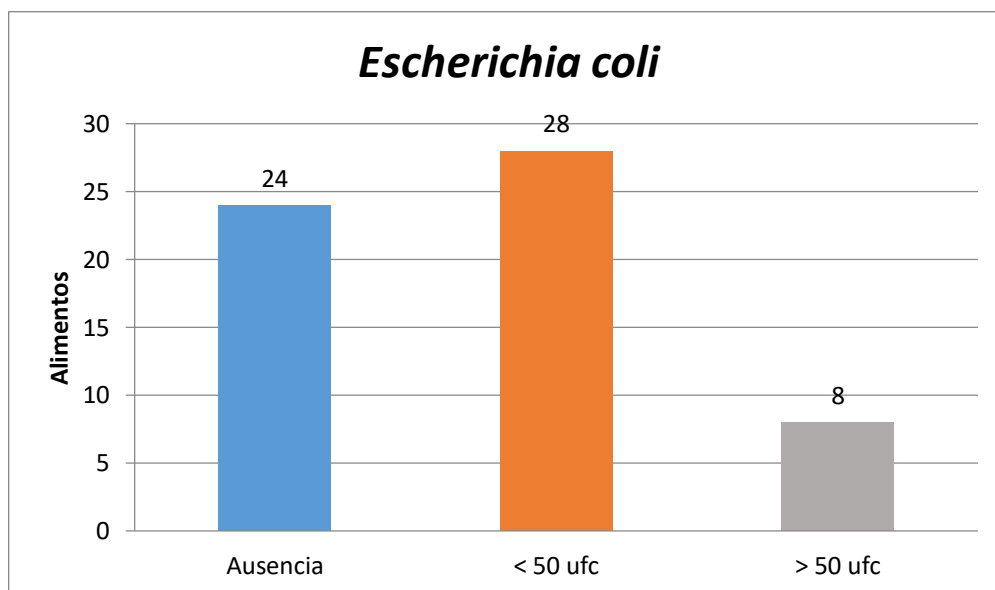


Figura 16. Resultados obtenidos a partir del análisis de los productos cárnicos frescos para determinar la presencia de *Escherichia coli*. Las columnas corresponden a los criterios límite que considera el reglamento.

Apoiando los resultados obtenidos se han encontrado extensos estudios sobre contaminación microbiana en productos cárnicos, como el siguiente en el cual recogen los alimentos de las propias fábricas. Este estudio incluye un total de 100 muestras, 20 (20%) hamburguesas, 30 (30%) Salchichas, 25 (25%) hamburguesas y albóndigas, 12 (12%) carne picada y 13 (13%) de otros tipos de productos cárnicos. Los resultados

mostraron que 44 (44%) de las muestras mostraron presencia de *Escherichia coli* (Osman *et al.*, 2018).

En otro estudio llevado a cabo para determinar el tipo de carne que más contaminación puede sufrir, encontraron que las más problemáticas eran la carne de vacuno, que tenía presencia en 20 de las 50 muestras (40 %) y el cerdo en 9 de 50 (18 %). Aunque encontraron una prevalencia media del 29 %, ninguna de las muestras superaba en carga microbiana los límites tolerables del reglamento Europeo (Scheinberg *et al.*, 2017).

Volviendo a los resultados del presente trabajo es fácil ver (Figura 17) la importante contaminación encontrada en estos productos, ya que como se puede observar tres quintos (60 %) del total mostraron presencia de esta bacteria y el 13 % de ellos superan el umbral del reglamento.

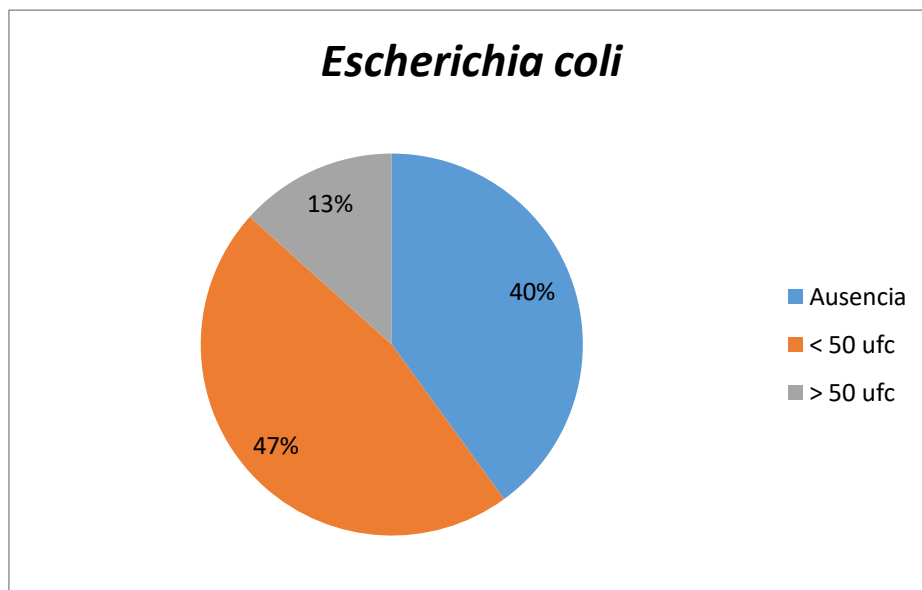


Figura 17. Porcentajes obtenidos de productos cárnicos contaminados con *E. coli*, frente al total de muestras analizadas en esta matriz.

- **Embutidos ahumados**

Por último, de la matriz de productos cárnicos se hizo distinción del grupo de los embutidos ahumados, ya que la normativa exige otros métodos y el control de otro microorganismo, *Listeria monocytogenes*.

En 2017, *L. monocytogenes* fue identificada como causante de 10 brotes causados por los alimentos, afectando a 39 personas de 6 países Europeos diferentes, según reporta

la EFSA. Sin embargo, en muestras de embutidos recogidos por autoridades competentes de Europa, de 203 analizados ninguno fue positivo para el crecimiento de *Listeria*. Por el contrario sí que fueron positivas muestras de otros productos cárnicos, el 4.4 % de 2031 alimentos analizados (EFSA and ECDC, 2018).

Consumiendo la cantidad de embutido que se consume en nuestro país y la tradición que hay de fabricación del mismo, se llevó a cabo un muestreo de 142 embutidos diferentes en una fábrica española de producción tradicional de éste producto, en la que se encontró un 15.8 % de prevalencia de *Listeria monocytogenes* (Martin *et al.*, 2011).

Datos preocupantes para el sector apoyados también por otros estudios, uno de ellos llevado a cabo en plantas industriales de producción de embutido, en el cual de 300 muestras analizadas, 30 (10 %) fueron positivas para la presencia de esta bacteria. (Thévenot *et al.*, 2005).

Estos datos no son tan preocupantes observando los resultados del presente estudio (Figuras 18 y 19), se puede observar que de 30 embutidos analizados, se encontró presencia de esta bacteria únicamente en uno de ellos. Por lo que el porcentaje de prevalencia baja considerablemente en comparación con los estudios mencionados, hasta el 3 % del total de las muestras analizadas.

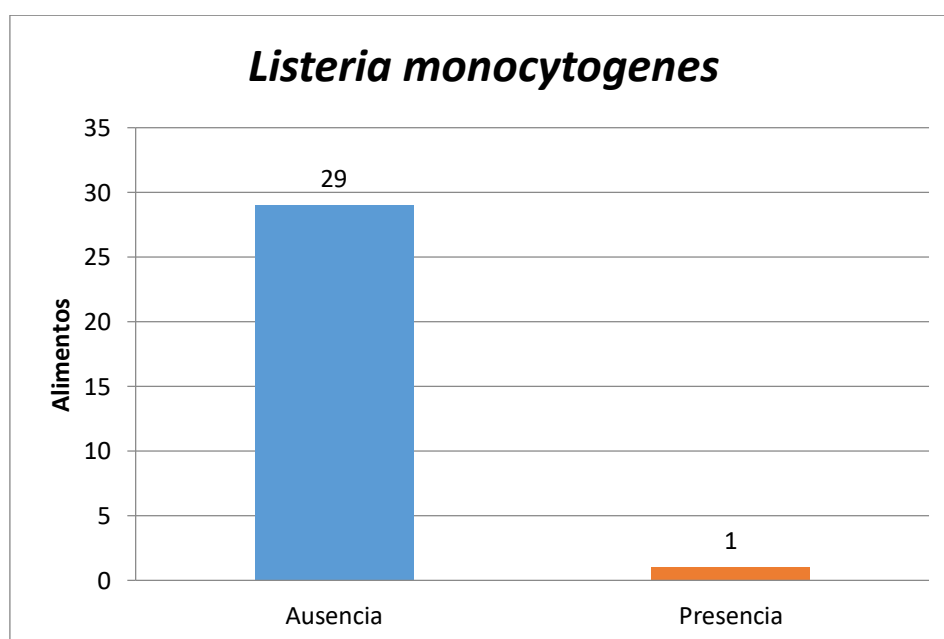


Figura 18. Resultados obtenidos a partir del análisis de las muestras de embutido ahumado para determinar la presencia de *Listeria monocytogenes*.

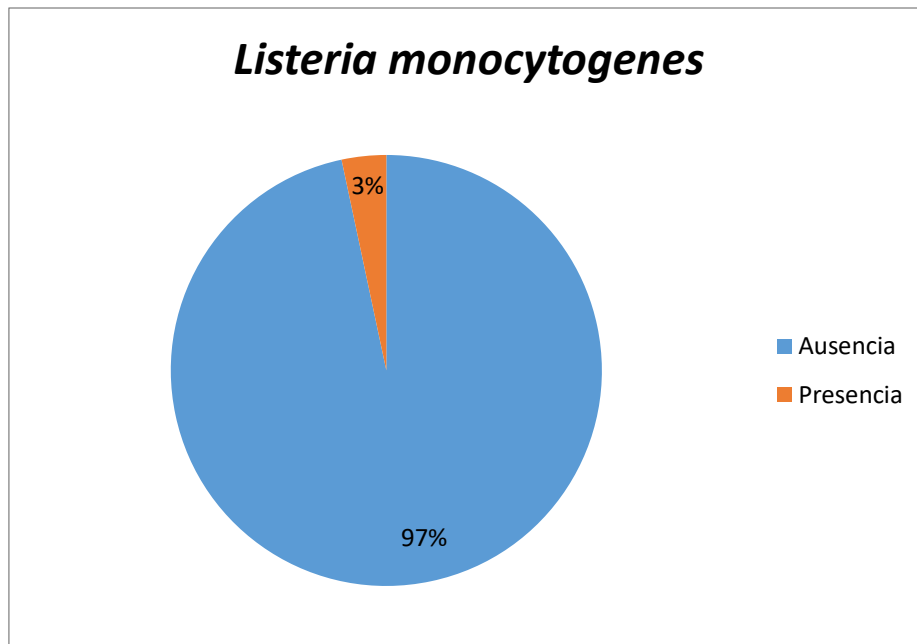


Figura 19. Porcentajes de embutidos ahumados con presencia de *L. monocytogenes* y embutidos libres de esta bacteria, frente al total de muestras analizadas.

#### 4. Conclusión

A pesar de los grandes esfuerzos que se hacen hoy en día, tanto por parte de la industria como por parte de los consumidores, para mantener la calidad de los productos alimenticios, los brotes y enfermedades provocados por alimentos siguen siendo un problema a nivel mundial.

Es importante remarcar que en este trabajo dos de las matrices estudiadas; pastelería y comida preparada, no parecen sufrir en exceso la contaminación microbológica, al menos de las bacterias analizadas en estos casos. Sin embargo, hablando de la matriz de productos cárnicos, concretamente el grupo de los frescos, alarman los datos de presencia de *Escherichia coli* observados, ya que más de la mitad de las muestras fueron positivas para la presencia de esta bacteria. Debido a su naturaleza *Escherichia coli* se utiliza sobre todo como un marcador de la higiene de los procesos, por lo que los resultados de este trabajo resaltan la necesidad de una monitorización continua de la cadena de producción, una evaluación de los métodos de limpieza y desinfección utilizados y su frecuencia, y finalmente la adopción de estrategias preventivas, para minimizar los riesgos de sanidad pública.

Por otro lado, según estudios realizados en los últimos años, el método de análisis mediante cultivo microbiológico podría no ser el más adecuado para esta tarea. En varias comparaciones de resultados obtenidos mediante este método y la PCR, el cultivo siempre ha demostrado ser menos sensible a la detección de concentraciones bajas de microorganismos. Por ejemplo, la prevalencia de *Salmonella spp.* en tartas, productos lácteos y comida preparada usando qPCR fue 11/14 (26.8%), 5/22 (22.7%), 32/150 (21.3%), and 5/20 (25%), respectivamente, comparando con el 0 % que se obtuvo en todos los casos mediante cultivo (Siala *et al.*, 2017).

Por lo que en este sentido, es importante que además en el control de la calidad alimentaria se mire hacia el futuro de técnicas de análisis ya disponibles actualmente, como la PCR, la secuenciación del genoma completo y secuenciaciones de nueva generación como los análisis metagenómicos y proteómicos.

## 5. Referencias bibliográficas

Van Asselt, E. D., Van der Fels-Klerx, H. J., Marvin, H. J. P., Van Bokhorst-van De Veen, H. and Nierop Groot, M. (2017) "Overview of Food Safety Hazards in the European Dairy Supply Chain", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, pp. 59–75.

Balzaretti, C. M. and 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(1), pp. 202–207.

Beccalli, M. P., Picozzi, C., Mangieri, N. and Vigentini, I. (2018) "Assessment of Microbial Populations in the Manufacture of Vacuum-Packaged Ready-to-Eat Roast Beef and in a Related Production Plant", *Journal of Food Protection*, 82(1), pp. 58–64.

Beuchat, L. R. and Ryu, J. (1997) "Produce Handling and Processing Practices", *Emerging Infectious Diseases*, 3(4), pp. 459–465.

Capalonga, R., Ramos, R. C., Both, J. M. C., Soeiro, M. L. T., Longaray, S. M., Haas, S. and Tondo, E. C. (2014) "*Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012", *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(7), pp. 811–817.

Comisión Europea. Reglamento (CE) n° 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) n° 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

D'Alessandro, A. and Zolla, L. (2012) "We Are What We Eat: Food Safety and Proteomics", *Journal of proteome*, 11, pp. 26–36.

European Food Safety Agency (EFSA) and European Centre for Disease Control (ECDC) (2018) "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017", *EFSA Journal*, 16(12), pp. 1–262.

European Food Safety Agency (EFSA) and European Centre for Disease Control (ECDC) (2015) "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013", *EFSA Journal*, 13, pp. 1-165.

Gutiérrez, D., Delgado, S., Vázquez-sánchez, D., Martínez, B., Cabo, L. and Rodríguez, A. (2012) "Incidence of *Staphylococcus aureus* and Analysis of Associated Bacterial Communities on Food Industry Surfaces", *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), pp. 8547–8554.

Kim, H. W., Kim, N. H., Cho, T. J., Park, S. M. and Kim, S. H. (2018) "Factors Affecting Microbiological Quality of Vegetable- and Meat-Based Meals Served at Cafeterias in the Republic of Korea", *Journal of Food Protection*, 81(11), pp. 1838–1843.

Kotzekidou, P. (2013) "Microbiological examination of ready-to-eat foods and ready-to-bake frozen pastries from university canteens", *Food Microbiology*, 34(2), pp. 337–343.

Martin, B., Garriga, M. and Aymerich, T. (2011) "Prevalence of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* at Small-Scale Spanish Factories Producing Traditional Fermented Sausages", *Journal of Food Protection*, 74(5), pp. 812–815.

Mughini-gras, L., Enserink, R., Friesema, I., Heck, M., Duynhoven, Y. Van and Pelt, W. Van (2014) "Risk Factors for Human Salmonellosis Originating from Pigs, Cattle, Broiler Chickens and Egg Laying Hens: A Combined Case-Control and Source Attribution Analysis", *PLoS ONE*, 9(2), pp. 1–9.



Nobili, G., Franconieri, I., La Bella, G., Basanisi, M. G. and La Salandra, G. (2017) "Prevalence of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from raw beef in southern Italy", *International Journal of Food Microbiology*, 257, pp. 201–205.

Norma UNE-EN ISO 16649 (2013) Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la enumeración de *Escherichia coli* beta-glucuronidasa positivo. Madrid: AENOR.

Norma UNE-EN ISO 16140 (2016). Microbiología de la cadena alimentaria. Validación de métodos. Madrid: AENOR.

Norma UNE-EN ISO 6579 (2017) Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella*. Madrid: AENOR.

Norma UNE-EN ISO 11290 (2018) Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria spp.* Madrid: AENOR.

Norma UNE-EN ISO 6888 (2019) Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa-positivos (*Staphylococcus aureus* y otras especies). Madrid: AENOR.

Normanno, G., Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, L., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Di Giannatale, E., Salinetti, A. P., La Salandra, G., Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Quaglia, N. C. and Celano, G. V. (2005) "Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy", *International Journal of Food Microbiology*, 98(1), pp. 73–79.

Osman, N. A. M., Suliman, S. E., Alian, Y. Y. and Abdalla, M. A. (2018) "Prevalence of *Salmonella*, *Escherichia coli* in Meat Products in Khartoum State", *Journal of Agricultural and Veterinary Sciences*, 19(1), pp. 68–76.

Piras, F., Spanu, C., Mocci, A. M., Demontis, M., De Santis, E. P. L. and Scarano, C. (2019) "Occurrence and traceability of *Salmonella spp.* in five Sardinian fermented sausage facilities", *Italian Journal of Food Safety*, 8, pp. 26–32.

Safarpour Dehkordi, F., Basti, A. A., Gandomi, H., Misaghi, A. and Rahimi, E. (2018) "Pathogenic *Staphylococcus aureus* in hospital food samples; prevalence and antimicrobial resistance properties", *Journal of Food Safety*, 38(6), pp. 1–6.

Scheinberg, J. A., Dudley, E. G., Campbell, J., Roberts, B., Marzio, M. D. I., Roy, C. D. E. B. and Cutter, C. N. (2017) "Prevalence and Phylogenetic Characterization of *Escherichia coli* and Hygiene Indicator Bacteria Isolated from Leafy Green Produce, Beef, and Pork Obtained from Farmers' Markets in Pennsylvania", *Journal of Food Protection*, 80(2), pp. 237–244.

Siala, M., Barbana, A., Smaoui, S., Hachicha, S., Marouane, C., Kammoun, S., Gdoura, R. and Messadi-Akrout, F. (2017) "Screening and detecting *Salmonella* in different food matrices in Southern Tunisia using a combined enrichment/real-time PCR method: Correlation with conventional culture method", *Frontiers in Microbiology*, 8, pp. 1–10.

Silva, F., Domingues, F. C. and Nerín, C. (2018) "Trends in microbial control techniques for poultry products", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(4), pp. 591–609.

Söderqvist, K. (2017) "Is your lunch salad safe to eat? Occurrence of bacterial pathogens and potential for pathogen growth in pre-packed ready-to-eat mixed-ingredient salads", *Infection Ecology & Epidemiology*, 7(1), pp. 1–7.

Sumner, S. S., Albrecht, J. A. and Peters, D. L. (1993) "Occurrence of Enterotoxigenic Strains of *Staphylococcus aureus* and Enterotoxin Production in Bakery Products", *Journal of Food Protection*, 56(8), pp. 722–724.

Thévenot, D., Delignette-Muller, M. L., Christieans, S. and Vernozy-Rozand, C. (2005) "Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products", *International Journal of Food Microbiology*, 102(1), pp. 85–94.

Uddin, J., Hossain, K., Hossain, S., Saha, K., Jubyda, F. T., Haque, R., Billah, B., Talukder, A. A., Parvez, A. K. and Dey, S. K. (2019) "Bacteriological assessments of foodborne pathogens in poultry meat at different super shops in Dhaka, Bangladesh", *Italian Journal of Food Safety*, 8, pp. 15–20.

Vázquez-sánchez, D., López-cabo, M., Saá-ibusquiza, P. and Rodríguez-herrera, J. J. (2012) "Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain )", *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), pp. 286–296.

World Health Organization (WHO) (2015) "WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007–2015", *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*

Yap, M., Chau, M. L., Pahm Hartantyo, S. H., Oh, J. Q., Aung, K. T., Alikiteaga Gutiérrez, R. and Ng, L. C. (2019) "Microbial Quality and Safety of Sushi Prepared with Gloved or Bare Hands: Food Handlers' Impact on Retail Food Hygiene and Safety", *Journal of Food Protection*, 82(4), pp. 615–622.

## 6. Anexo

- Pastelería

Tabla 2. Resultados obtenidos del análisis de 60 productos de pastelería para la determinación de la presencia de *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus*.

	<b>Alimento</b>	<b><i>Salmonella spp.</i></b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>
0422	Torpedo crema	Ausencia	38
0421	Marañuela	Ausencia	Ausencia
0419	Milhojas nata y crema	Ausencia	Ausencia
0416	Canutillo crema	Ausencia	20
0414	Milhojas crema merengue	Ausencia	40
0410	Pastel yema	Ausencia	Ausencia
0409	Tarta de piña	Ausencia	Ausencia
0405	Brazo gitano chocolate	Ausencia	Ausencia
0395	Soufflé	Ausencia	Ausencia
0394	Tarta queso	Ausencia	Ausencia
0384	Pirámide	Ausencia	Ausencia
0383	Tarta de canela, limón y arroz con leche	Ausencia	Ausencia
0382	Mousse de turrón	Ausencia	Ausencia
0375	Cucurucho chantilly	Ausencia	Ausencia
0374	Pionono	Ausencia	Ausencia
0372	Tarta queso	Ausencia	Ausencia
0371	Bizcocho chocolate	Ausencia	Ausencia
0370	Hojaldre de crema	Ausencia	Ausencia
0365	Milhojas crema merengue	Ausencia	Ausencia
0361	Negrito	Ausencia	Ausencia
0357	Mojicón	Ausencia	Ausencia
0356	Milhojas crema merengue	Ausencia	Ausencia
0350	Petisú chantilly	Ausencia	Ausencia
0345	Croissant crema	Ausencia	Ausencia
0344	Milhojas crema merengue	Ausencia	Ausencia
0321	Brazo de gitano	Ausencia	Ausencia
0319	Pepito crema	Ausencia	Ausencia
0318	San Marcos	Ausencia	Ausencia
0312	Tecla chantilly	Ausencia	Ausencia
0294	Pastel de bizcocho	Ausencia	Ausencia
0293	Pastel crema y merengue	Ausencia	Ausencia
0284	Tarta Duque	Ausencia	Ausencia
0274	Milhojas crema merengue	Ausencia	Ausencia
0265	Pastel Piñole	Ausencia	Ausencia
0264	Milhojas crema merengue	Ausencia	Ausencia
0263	San Marcos	Ausencia	Ausencia
0262	Tarta queso y chocolate	Ausencia	Ausencia
0261	Milhojas crema merengue	Ausencia	Ausencia

0259	Milhojas pistacho	Ausencia	Ausencia
0254	Milhojas crema y merengue	Ausencia	Ausencia
0253	Tarta queso	Ausencia	Ausencia
0244	Mousse chocolate y vainilla	Ausencia	Ausencia
0236	Pinocho	Ausencia	Ausencia
0232	Pastel bizcocho yema y almendra	Ausencia	Ausencia
0227	Milhojas crema y merengue	Ausencia	Ausencia
0226	Brazo gitano	Ausencia	Ausencia
0221	Tarta de pera	Ausencia	Ausencia
0215	Mantecados	Ausencia	Ausencia
0213	Tarta de queso	Ausencia	Ausencia
0207	Bizcocho nata y trufa	Ausencia	Ausencia
0206	Milhojas crema	Ausencia	Ausencia
0203	Petisú crema	Ausencia	Ausencia
0194	Tarta milhojas	Ausencia	Ausencia
0193	Buñuelos crema	Ausencia	Ausencia
0183	Casadiella nuez frita	Ausencia	Ausencia
0182	Brownie	Ausencia	Ausencia
0180	Milhojas crema merengue	Ausencia	Ausencia
0178	Triángulo crema	Ausencia	Ausencia
0171	Croissant crema	Ausencia	Ausencia
0156	Cascarillas	Ausencia	Ausencia

- **Comida preparada**

Tabla 3. Resultados obtenidos del análisis de 60 muestras de comida preparada para la determinación de la presencia de *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*.

	<b>Alimento</b>	<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>
0415	Pimientos del piquillo rellenos de carne	Ausencia	Ausencia
0407	Merluza a la romana	Ausencia	Ausencia
0406	Cebolla rellena picadillo	Ausencia	Ausencia
0404	Tomate relleno de bonito	Ausencia	Ausencia
0403	Sándwich vegetal	Ausencia	Ausencia
0396	Pastel de pescado	Ausencia	Ausencia
0381	Lasaña carne	Ausencia	Ausencia
0362	Puré variado	Ausencia	< 10
0348	Carrilleras	Ausencia	Ausencia
0347	Sándwich vegetal de tortilla francesa	Ausencia	Ausencia
0346	Pincho merluza a la romana	Ausencia	Ausencia
0340	Pollo asado	Ausencia	Ausencia
0317	Pastel de cabracho	Ausencia	Ausencia
0310	Cachopo champiñones	Ausencia	Ausencia
0309	Cachopo cecina	Ausencia	Ausencia

0308	Ensalada mixta	Ausencia	Ausencia
0307	Emberzado	Ausencia	Ausencia
0304	Lenguado a la romana	Ausencia	Ausencia
0296	Crema de verduras	Ausencia	Ausencia
0295	Callos	Ausencia	Ausencia
0292	Lomo sopa	Ausencia	Ausencia
0291	Pastel de cabracho	Ausencia	Ausencia
0283	Ternera asada	Ausencia	Ausencia
0275	Gunkan de foie y anguila	Ausencia	Ausencia
0273	Cachopo ternera jamón	Ausencia	Ausencia
0266	Puré de pollo	Ausencia	Ausencia
0257	Ternera rellena	Ausencia	Ausencia
0256	Pollo pango	Ausencia	Ausencia
0252	Ensalada mixta	Ausencia	Ausencia
0250	Pastel de pescado	Ausencia	Ausencia
0231	Macarrones a la boloñesa	Ausencia	Ausencia
0214	Puré variado	Ausencia	Ausencia
0212	Sándwich vegetal	Ausencia	Ausencia
0205	Relleno de marisco	Ausencia	40
0199	Paté de verduras	Ausencia	Ausencia
0185	Ensaladilla rusa	Ausencia	Ausencia
0177	Tortilla patata	Ausencia	Ausencia
0176	Paella mixta	Ausencia	Ausencia
0175	Pincho pollo, lechuga y tomate	Ausencia	Ausencia
0170	Pincho pollo, lechuga y mahonesa	Ausencia	Ausencia
0159	Salpicón de Marisco	Ausencia	65
0155	Cachopo Vaqueiro	Ausencia	Ausencia
0140	Pincho pollo a la plancha	Ausencia	Ausencia
0133	Cachopo de carne	Ausencia	Ausencia
0132	Fabes con almejas	Ausencia	Ausencia
0131	Salpicón de marisco	Ausencia	Ausencia
0129	Puré verduras	Ausencia	Ausencia
0128	Ensaladilla rusa	Ausencia	Ausencia
0111	Pimientos rellenos de carne	Ausencia	Ausencia
0104	Musaka	Ausencia	Ausencia
0102	Puré Variado	Ausencia	Ausencia
0095	Cordero guisado	Ausencia	Ausencia
0075	Maki de Atún	Ausencia	Ausencia
0066	Cachopo La Peral	Ausencia	Ausencia
0042	Pastel de Cabracho	Ausencia	Ausencia
0038	Paté de pescado	Ausencia	Ausencia
0035	Pincho integral vegetal	Ausencia	Ausencia
0023	Cachopo de pollo corral, jamón y queso	Ausencia	Ausencia
0022	Nigiri de atún con yozu	Ausencia	Ausencia
0010	Cachopo de pollo	Ausencia	< 10

- **Productos cárnicos frescos**

Tabla 4. Resultados obtenidos del análisis de 60 productos cárnicos frescos para la determinación de la presencia de *Salmonella spp.* y *Escherichia coli*.

	<b>Alimento</b>	<b><i>Salmonella spp.</i></b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>
0413	Albóndigas ternera cerdo	Ausencia	140
0412	Pinchos morunos	Ausencia	Ausencia
0411	Longaniza roja fresca	Ausencia	< 50
0400	Chorizo criollo	Ausencia	Ausencia
0399	Picadillo	Ausencia	< 50
0398	Burger meat ternera	Ausencia	Ausencia
0397	Picadillo chorizo extra	Ausencia	< 50
0386	Picadillo chorizo	Ausencia	Ausencia
0385	Hamburguesa ternera	Ausencia	80
0379	Burger meat ternera cerdo	Ausencia	20
0378	Pinchos morunos pollo	Ausencia	Ausencia
0377	Picadillo chorizo	Ausencia	< 50
0373	Picadillo chorizo	Ausencia	11
0369	Burger meat ternera	Ausencia	Ausencia
0366	Burger meat ternera	Ausencia	Ausencia
0363	Salchicha roja	Ausencia	Ausencia
0343	Picadillo chorizo	Ausencia	< 50
0342	Chorizo fresco	Ausencia	< 50
0336	Burger meat vacuno	Ausencia	2,4x10 <sup>5</sup>
0325	Burger meat pollo	Ausencia	< 50
0322	Carne picada ternera	Ausencia	< 50
0316	Albóndigas ternera, cerdo y pollo	Ausencia	< 50
0315	Burger meat pollo	Ausencia	< 50
0314	Burger meat pollo	Ausencia	< 50
0303	Hamburguesa de pollo	Ausencia	Ausencia
0302	Albóndigas ternera cerdo	Ausencia	Ausencia
0285	Burger meat ternera	Ausencia	Ausencia
0282	Burger meat ternera	Ausencia	56
0281	Hamburguesa ternera	Ausencia	Ausencia
0278	Picadillo chorizo	Ausencia	Ausencia
0277	Picadillo chorizo	Ausencia	Ausencia
0276	Longaniza blanca fresca	Ausencia	Ausencia
0272	Burger meat pollo	Ausencia	< 50
0271	Burger meat pollo	Ausencia	< 50
0270	Burger meat pollo	Ausencia	< 50
0269	Burger meat buey	Ausencia	Ausencia
0268	Burger meat ternera	Ausencia	Ausencia
0267	Hamburguesa pollo	Ausencia	Ausencia
0255	Chorizo criollo	Ausencia	< 50

0249	Picadillo de chorizo	Ausencia	< 50
0248	Longaniza roja fresca	Ausencia	21
0247	Longaniza roja fresca	Ausencia	19
0241	Picadillo chorizo	Ausencia	Ausencia
0240	Burger meat pollo	Ausencia	55
0239	Chorizo criollo	Ausencia	< 50
0230	Picadillo chorizo	Ausencia	30
0229	Picadillo chorizo	Ausencia	< 50
0228	Burger meat ternera cerdo	Ausencia	Ausencia
0225	Hamburguesa pollo	Ausencia	28
0224	Picadillo chorizo	Ausencia	Ausencia
0223	Burger meat pollo	Ausencia	Ausencia
0222	Longaniza blanca fresca	Ausencia	< 50
0220	Picadillo chorizo	Ausencia	Ausencia
0219	Burger meat cerdo pavo	Ausencia	< 50
0217	Picadillo chorizo	Ausencia	Ausencia
0216	Hamburguesa pollo	Ausencia	28
0211	Masa albóndigas ternera	Ausencia	< 50
0210	Picadillo chorizo	Ausencia	7,5 x 10 <sup>3</sup>
0196	Picadillo chorizo	Ausencia	6,6 x 10 <sup>2</sup>
0164	Albóndigas ternera cerdo	Ausencia	85

- **Embutidos ahumados**

Tabla 5. Resultados obtenidos del análisis de 30 muestras de embutidos ahumados para la determinación de la presencia de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*.

	<b>Alimento</b>	<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>
0402	Chorizo ahumado extra	Ausencia	Ausencia
0401	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
0376	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
0359	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
0358	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
0338	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
0337	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
0323	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
0311	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
0238	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
0235	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
0234	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
0233	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
0200	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
0181	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
0169	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia



<b>0166</b>	Chorizo ahumado pollo	Ausencia	Ausencia
<b>0165</b>	Chorizo ahumado	Ausencia	Presencia
<b>0151</b>	Chorizo picante ahumado	Ausencia	Ausencia
<b>0146</b>	Morcilla Ahumada	Ausencia	Ausencia
<b>0139</b>	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
<b>0138</b>	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
<b>0118</b>	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
<b>0116</b>	Chorizo extra	Ausencia	Ausencia
<b>0115</b>	Chorizo	Ausencia	Ausencia
<b>0097</b>	Morcilla ahumada	Ausencia	Ausencia
<b>0073</b>	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
<b>0071</b>	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
<b>0069</b>	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia
<b>0058</b>	Chorizo ahumado	Ausencia	Ausencia