

**Detección De Patógenos Antes, Durante Y Después Del Proceso de
Cocción En Alcapurrías De Jueyes
(*Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825)**

Por

Maridia Rosario Passapera

Tesis sometida en cumplimiento parcial
de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Ciencia y Tecnología de Alimentos

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2005

Aprobado por:

Wanda Rodríguez Toro, M.S.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Francisco Fuentes, PhD.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Edna Negrón de Bravo, PhD.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Mildred Chaparro, PhD.
Presidenta, Comité Graduado

Fecha

María M. Vargas, PhD.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Edna Negrón de Bravo, PhD.
Directora del Departamento

Fecha

Abstract

“Alcapurrias de jueyes” are one of autochthonous Puerto Rican foods. The batter of this product is a mix of green banana (*Musa paradisiaca*), tannier (*Xanthosoma spp.*) and /or cassava (*Manihot esculenta*). The batter is filled with crabmeat (*Cardisoma guanhumi*) and the product is fried in hot oil. A study was carried out to determine the microbial quality of raw and cooked samples from different areas of Puerto Rico. Samples from 13 sites were taken and analyzed in order to evaluate microbial density and presence of foodborne pathogens: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. Samples already cooked showed a decrease in microbial density as expected, but after two hours some samples showed a microbial increase in *Staphylococcus aureus*. Traditional isolation and identification methodology and modern identification techniques were used. Differences in microbial density of raw product were confirmed. A general HACCP plan was developed for this product.

Resumen

La alcapurria de jueyes es una de las comidas típicas puertorriqueñas. El producto es manufacturado a base de masa de guineo verde (*Musa paradisiaca*), yautía (*Xanthosoma spp.*) y/o yuca (*Manihot esculenta*) rayados. La masa se rellena con carne de jueyes (*Cardisoma guanhumi*) y luego se fríe en aceite caliente. Se realizó un estudio para determinar la calidad microbiológica de este producto crudo y cocido. Muestras de 13 kioscos fueron analizadas para aislar e identificar los patógenos más comunes relacionados a enfermedades alimentarias como los son *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*. Las muestras fritas como se esperaba, mostraron una disminución en la densidad microbiana, pero luego de dos horas algunas de las muestras mostraron un aumento microbiano de *Staphylococcus aureus*. Se utilizó metodología tradicional como modernas para la identificación. Se confirmaron diferencias en la densidad microbiológica de las muestras crudas. Un plan HACCP general fue diseñado para este producto.

Derechos de Autor Reservados[©]
Maridia Rosario Passapera
2005

Dedicatoria

A mi gran y único amor, mi Señor, mi Jesús, gracias por hacerme reconocer que soy débil y que te necesito siempre, que contigo lo puedo todo, pero sin ti Señor, no puedo hacer nada. Gracias por mi Santa Madre del Cielo, mi Inmaculada Virgen María por su compañía eterna y sus cuidados maternales, que siempre los palpé a lo largo de esta travesía. A mi amor puro de Dios (ángel de mi guarda), gracias por cuidarme, protegerme y velar mi andar. A S.P. Pio de Pieltrecina (mi Fra Pio) mi santo protector gracias por tu intercesión delante de Dios por mí y por confirmarme que estás siempre conmigo. A S. Francisco de Asís, S. Rita de Casia, S. Cristóbal, Beato Carlos Manuel Rodríguez (Charlie) y S.S. Juan Pablo II. GRACIAS.

A mis padres María y Richard y a mi hermano Richy, gracias por su apoyo incondicional. A Titi Coco, Tio Roberto, Tio Hosto, Titi Vita y a mis abuelos gracias por su ayuda y oraciones.

A la Comunidad Benedictina de la Abadía de San Antonio Abad en Humacao, gracias por sus oraciones y apoyo espiritual (Esp. P. Eric Buermann, O.S.B., P. Eduardo Torrellas, O.S.B. y Hermano Antonio Hernández Gierbolini, O.S.B.).

A Yaritza Fontáñez Barris (Yarie) gracias haz dado cátedra de lo que significa la palabra amistad. Gracias amiga por toda tu ayuda, te estaré eternamente agradecida.

A Prof. Wanda Rodríguez Toro y Dr. Francisco Fuentes, este proyecto surgió como una idea, hoy se convierte en una hermosa realidad. Sin su ayuda, apoyo, esfuerzo, consejos y tiempo no se hubiera hecho posible. Estaré en deuda con ustedes por siempre GRACIAS.

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Francisco Fuentes, por haberme permitido utilizar las facilidades del laboratorio de ecología microbiana en Universidad de Puerto Rico en Humacao. A Prof. Iván Dávila por la ayuda y consejería brindada en la parte estadística de este proyecto. A Dra. Lilliam Casillas y Dra. Carmen Hernández por haberme permitido utilizar las facilidades de los laboratorios de geología y celular molecular en la Universidad de Puerto Rico en Humacao para la realización este trabajo, Gracias.

A los miembros del Departamento de Salud de Puerto Rico, especialmente a Rita Goytía, MS, CFSP, Directora de la División de Higiene de Alimentos y a Yaniré García Guadalupe, MPH, Bioestadística de la División de Epidemiología, por su tiempo, ayuda e información brindada para el enriquecimiento de este trabajo, Gracias.

Al Sr. Ronald Flores y su excelente equipo de trabajo de Casiano Movie Magazine, por el recurso visual de *Cardisoma guanhumi*, Gracias.

A Aida Cáceres (kiosco 43-Luquillo) por su tiempo y disponibilidad en enseñarme el arte de manufacturar las alcapurrias de jueyes. Gracias.

A Ivette Vissepo por sus oraciones y buenos consejos, Gracias Bessie.

A Dra. Mildred Chaparro por permitirme formar parte de su grupo de estudiantes graduados y por la ayuda brindada en todo momento. A Dra. Edna Negrón por permitirme ser estudiante graduada del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos y por la ayuda económica brindada para sufragar el costo de los materiales de investigación, Gracias.

Tabla de Contenido

Lista de Tablas.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de apéndices.....	x
Introducción.....	1
Revisión Literaria.....	4
Materiales y Métodos.....	12
• Obtención de muestras.....	12
• Análisis de muestras.....	15
• Contaje Total.....	16
• Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
• Aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	17
• Aislamiento de <i>Escherichia coli</i>	18
• Preparación de muestras para Vitek.....	19
• Preparación de muestras para Biolog.....	21
• Análisis Estadístico.....	22
Resultados.....	23
Discusión.....	43
Conclusión.....	53
Plan HACCP general para alcapurrias de jueyes.....	55
Recomendaciones.....	66
Referencias.....	67

Lista de Tablas

Tabla 1. Localización y metodología utilizada en los kioscos donde se llevó el muestreo a cabo.....	13
Tabla 2. Densidad de heterotrófos promedio de muestras de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.....	24
Tabla 3. Análisis estadístico (ANOVA) Modelo II sobre la densidad de heterotrofos promedio de muestras de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.....	25
Tabla 4. Resultados promedios para la presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en el medio MSA para alcapurrias de jueyes en Puerto Rico	26
Tabla 5. Resultados promedios para la presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> en el medio BP para alcapurrias de jueyes en Puerto Rico	27
Tabla 6. Análisis estadístico (ANOVA) Modelo I sobre los resultados del medio MSA en las muestras de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.....	28
Tabla 7. Análisis estadístico (ANOVA) Modelo I sobre los resultados del medio BP en las muestras de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.....	29
Tabla 8. Prueba de ajuste “Goodness of Fit” para resultados en MSA.....	29
Tabla 9. Prueba de ajuste “Goodness of Fit” para resultados en BP.....	29
Tabla 10. Análisis de tablas de contingencia para la diferencia entre los perfiles de recuperación de <i>Staphylococcus aureus</i> en los medios MSA y BP....	30
Tabla 11. Resultados positivos mediante el método tradicional para la identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.....	31
Tabla 12. Resultados positivos mediante métodos automatizados para la identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.....	32
Tabla 13. Resultados promedios para la presencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en el medio Oxford tomada del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico....	33
Tabla 14. Resultados promedios para la presencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en el medio Palcam tomada del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico....	34

Tabla 15. Resultados promedios para la presencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en el medio McBride tomada del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.	36
Tabla 16. Prueba de ajuste “Goodness of Fit” para resultados en Oxford.	37
Tabla 17. Prueba de ajuste “Goodness of Fit” para resultados en Palcam.	37
Tabla 18. Análisis de tablas de contingencia para la diferencia entre los perfiles de recuperación de <i>Listeria monocytogenes</i> en los medios Oxford, Palcam y McBride.	38
Tabla 19. Resultados positivos mediante el método tradicional para la identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.	39
Tabla 20. Resultados positivos mediante métodos automatizados para la identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.	39
Tabla 21. Resultados de coliformes fecales para la prueba del número más probable (NMP) tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.	41
Tabla 22. Resultados positivos mediante el método tradicional para la identificación de <i>Escherichia coli</i> tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.	42
Tabla 23. Resultados positivos mediante el método tradicional para la identificación de <i>Escherichia coli</i> tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.	42

Lista de figuras

Figura 1. Mapa de las regiones de muestreo en Puerto Rico.....	12
Figura 2. Diagrama de muestreo y transporte de muestras.....	14
Figura 3. Diagrama de análisis de muestra.....	15
Figura 4. Densidad promedio de heterotrofos cultivables en 13 kioscos en Puerto Rico.....	24
Figura 5. Densidad promedio de <i>Staphylococcus aureus</i> en el medio MSA para alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.....	27
Figura 6. Densidad promedio de <i>Staphylococcus aureus</i> en el medio BP para alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.....	28
Figura 7. Presencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en el medio Oxford en alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.....	33
Figura 8. Presencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en el medio Palcam en alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.....	35
Figura 9. Presencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en el medio McBride en alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.....	36
Figura 10. Resultados de coliformes fecales para la prueba NMP tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.....	41

Lista de apéndices

Apéndice 1: Proceso de manufactura de alcapurria de jueyes.....	72
Apéndice 2: Enfermedades de notificación obligatoria según el Departamento de Salud de Puerto Rico.....	73
2A. Enfermedades entéricas de notificación obligatoria en Puerto Rico para los años 1999-2003.....	73
2B. Enfermedades entéricas de notificación obligatoria en Puerto Rico para los años 2001-2002 (Boletín Epidemiológico 19(2)).....	74
2C. Enfermedades entéricas de notificación obligatoria en Puerto Rico según la Ley 81, Rev. 1ro de marzo de 2004, Orden Administrativa Num. 177.....	76
Apéndice 3: Ejemplo de un árbol de decisiones para identificar los puntos críticos de control (PCC).....	78

Introducción

Una de las preocupaciones principales para la industria de alimentos lo es el aspecto de la seguridad de los productos. Dicha preocupación se justifica a la luz de la información presentada por agencias reguladoras locales, federales e internacionales. Los datos recopilados durante la última década revelan un aumento en la incidencia de enfermedades causadas por la ingestión de alimentos procesados (Weitzman *et al*, 2001). La sintomatología presentada por el o los individuos afectados se ha asociado principalmente con la ingestión de toxinas producidas por microorganismos o con la ingesta del microorganismo en sí (Frazier y Westhoff, 1988).

Es conocida la importancia que tiene el establecer controles de calidad sobre la materia prima utilizada para la confección de un producto y sobre los métodos utilizados en los procesos de manufactura, almacenaje y distribución del producto. Cada una de las etapas del proceso de elaboración puede convertirse en fuente de contaminación para el producto. La calidad de los alimentos procesados es regulada por varias agencias y existe, inclusive un Código de Alimentos (Food Code) que orienta al productor sobre los parámetros de calidad y Buenas Prácticas de Manufactura (GMP's- "Good Manufacture Practices") de los alimentos.

En Puerto Rico se producen y consumen una serie de platos confeccionados por combinación de grupos de alimentos. Esos productos son propios de la tradición culinaria y comúnmente se refiere a ellos como platos típicos. El consumo de platos confeccionados con mariscos, especialmente crustáceos (langosta, camarones y jueyes)

están entre los más populares en la población. Estos productos marinos son más perecederos que otros alimentos que también presentan un alto contenido de proteínas (Nickelson et al, 2001). En los mariscos el cambio en sabor, olor, textura y color refleja el nivel de frescura y el nivel de descomposición de los mismos, lo cual es causado principalmente por actividad microbiana. La presencia de contaminación microbiana en productos marinos está usualmente relacionada con un potencial de desarrollo de enfermedades en alimentos (Nickelson et al, 2001).

Dentro de la gama de productos típicos, las alcapurrias de jueyes tienen un lugar de prominencia, particularmente en las zonas costeras del país. Como le ocurre a la mayoría de los platos típicos, la elaboración de este producto no está sujeta a una reglamentación de calidad microbiológica que permita establecer:

1. Parámetros que aseguren la calidad en la producción y manejo del producto que se le ofrece al consumidor.
2. El potencial como reservorio de patógenos en ese alimento.
3. Riesgos de desarrollo de intoxicaciones o infecciones alimentarias debido a la ingestión del producto.

Los productos que contienen varios ingredientes y cuya confección envuelve un gran alto grado de manipulación resultan en vectores potenciales de patógenos alimentarios. El potencial de peligro a la salud se determina precisamente mediante la detección de patógenos a través de pruebas microbiológicas cuantitativas y cualitativas a lo largo de todo el proceso, desde su manufactura hasta su consumo.

El objetivo es determinar la calidad microbiológica en las alcapurrias de jueyes, a través de las etapas que conlleva su manufactura hasta el momento previo a su consumo.

El estudio incluye pruebas para determinar la presencia de tres de los patógenos más comunes relacionados a enfermedades alimentarias: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Hipótesis:

Existe una alta posibilidad de encontrar patógenos alimentarios en las alcapurrias de jueyes, debido a que éste; 1) es un producto manipulado, 2) su materia prima contiene gran variedad de ingredientes que sostienen el crecimiento de microorganismos entre ellos la carne de jueyes, 3) procesos de elaboración del mismo conllevan contacto con materiales potencialmente contaminados.

Revisión de Literatura

La mayoría de las enfermedades alimentarias provienen del consumo de patógenos microbianos y/o toxinas microbianas presentes en alimentos. El riesgo de este tipo de enfermedad es la combinación de la exposición al patógeno, infección o intoxicación y la severidad de la enfermedad desarrollada. En un sistema tan complejo como la producción y el consumo de alimentos, muchos factores afectan la presencia y severidad de la ocurrencia en las enfermedades alimentarias (Lammerding *et al.*, 2001).

Algunos de los factores más importantes que se relacionan a brotes de enfermedades asociadas con alimentos son: contaminación cruzada, enfriamiento inadecuado, cocción inadecuada, pobre higiene del personal a cargo de la preparación del alimento y la utilización de equipo contaminado (Weitzman *et al.*, 2001). Por otro lado la manipulación intensa en la confección de un producto puede representar un peligro a la salud. Un manejo elaborado aumenta las probabilidades de que se desarrolle una mayor contaminación microbiana, ya que no se trata solo de la densidad microbiana sino de la carga microbiana a través de las etapas de procesamiento (de Caloni y Fernández, 1983).

Existen más de 3000 especies diferentes de mariscos comestibles alrededor del mundo. De éstas, más de 250 especies están disponibles para el consumo en los Estados Unidos y Puerto Rico. Factores que afectan la calidad microbiológica de los mariscos son: la especie seleccionada, la calidad ambiental del hábitat donde éste crece, los métodos de captura y manejo utilizados, las técnicas de procesamiento, el tipo y concentración de preservativos y el método y material de empaque utilizado (Ward y Baj, 1988).

El envenenamiento con mariscos es casi siempre el resultado del mal manejo durante y después de la preparación del producto (Nickelson *et al.*, 2001). La prevención de este tipo de enfermedad se puede llevar a cabo mediante la cocción, evitando la contaminación cruzada y con una refrigeración adecuada de los mariscos crudos (Goh, 2002).

Hoy día se utilizan criterios microbiológicos para determinar la calidad e inocuidad de los alimentos. Sin embargo no existe mucha información acerca de la calidad microbiológica de productos alimenticios típicos de Puerto Rico. Entre estos productos se encuentran las alcapurrías de jueyes. Las alcapurrías se clasifican como un producto procesado ya que el mismo está elaborado a base de una masa de plátano (*Musa acuminata x balbisiana AAB*), yautía (*Xanthosoma spp.*) y yuca (*Manihot esculenta*) rayados (de Caloni y Cruz, 1984). El relleno de las alcapurrías de jueyes se compone de carne de jueyes guisada. La especie de juey que se utiliza para confeccionar dicho producto es *Cardisoma guanhumii* (Latreille, 1825). Esta es la única especie dentro de dicha familia que es explotada comercialmente de forma significativa en la Isla (Riesco y Cepeda, 1996). Este tipo de crustáceo habita en estuarios en el Caribe, América Central y América del Sur incluyendo Colombia, Venezuela, Las Bahamas y Puerto Rico (Schlesinger, 2002). La carne de juey que proviene de las quelas y sus patas tiene un sabor particular y delicioso. Dicha carne se prepara en asopao, salmorejo, con arroz, como relleno para alcapurrías, empanadillas y en otros platos (Riesco y Cepeda, 1996).

Luego de manufacturado, el producto se fríe en aceite abundante a una temperatura alta de 177°C (350°F). Al completar el proceso de cocción, el producto se

exponen o se mantienen bajo luz incandescente en gabinetes de exposición o vidrieras hasta el momento de consumirlas a una temperatura de aproximadamente 38°C (100°F) (Fernández, 1985).

La sobrevivencia de la microflora natural, la multiplicación de los microorganismos durante el almacenaje de los jueyes antes de la confección del producto, y la contaminación post-cocido contribuyen al número y tipo de bacterias encontradas en la carne de jueyes (Nickelson *et al.*, 2001). Existen varios factores claves que ponen en riesgo la calidad de las alcapurrías de jueyes:

- El consumidor tiende a ingerir este tipo de producto sin un proceso térmico previo (recalentar) al de cocción mismo.
- La contaminación bacteriana que proviene de fuentes ambientales como animales, suelo y agua. La carne de jueyes provee un medio excelente de crecimiento microbiano ya que provee vitaminas, minerales, alta humedad, proteínas y su pH es cerca de 7.0.
- Las pocas prácticas de higiene en el personal que manufactura este tipo de alimento.

La carne de jueyes se deteriora rápidamente inclusive bajo las mejores condiciones de almacenaje (Webb *et al.*, 1973). La cocción correcta antes de la extracción de la carne destruye la mayoría de los microorganismos (Van Arsdel *et al.*, 1959). Una buena sanitización del área y un almacenaje a temperatura de refrigeración (4°C) de la carne de jueyes luego de cocida, es de gran importancia para mantener un producto de buena calidad (Ward *et al.*, 1977).

Uno de los factores más importantes de la calidad microbiológica de los mariscos es el proceso adecuado de enfriamiento luego de la cocción de la carne (OH *et al.*, 1992). Este último punto es crítico cuando la alcapurria se está manufacturando. La carne de jueyes si no está cocida al momento (humeando), debe mantenerse a una temperatura baja (4°C) evitando que llegue a temperatura ambiente (25°C) ya que puede convertirse en una vía de contaminación para dicho producto, colocando en peligro la inocuidad del alimento.

La temperatura del ambiente que rodea al alimento se reconoce como un factor esencial en la preservación del producto (Raccach y Henningsen, 1997). Cuando el alimento se encuentra cocido, pero no se va a consumir en el momento se recomienda que el mismo se mantenga en una temperatura lo suficientemente alta (57°C) ya que puede ser un vehículo de contaminación bacteriana por abuso de temperatura. A medida que el alimento se va enfriando se acerca a temperatura ambiente (25°C), lo cual lo hace más vulnerable a contaminación por microorganismos mesofílicos. Esta es la razón por la cual este tipo de producto luego de ser frito se mantiene en vidrieras con luz incandescente.

La práctica de mantener los alimentos tibios hasta el momento de ser consumidos pretende mantener la calidad e inocuidad microbiológica (Fernández, 1983). Luego de la cocción del alimento es importante el uso de una temperatura adecuada de almacenaje para prevenir el crecimiento microbiano. En resumen las buenas prácticas sanitarias y el manejo adecuado de temperatura tienen como resultado un producto que es inocuo y no perecedero a corto plazo (OH *et al.*, 1992).

Generalmente el crecimiento microbiano no controlado en los alimentos es indeseable ya que puede ocasionar cambios en textura, en sabor (Jensen *et al.*, 1997) o bien puede originar una enfermedad alimenticia. Las bacterias son en gran medida las causantes de muchos de los cambios no deseados en los alimentos. Entre las bacterias patogénicas que se aíslan con más frecuencia en alimentos procesados a base de mariscos se encuentran: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* (Nickelson *et al.*, 2001).

Staphylococcus aureus es un coco gram positivo, anaeróbico facultativo de aproximadamente 1µm de diámetro con arreglo de racimo de uvas. La característica distintiva de las cepas patogénicas de este organismo es la reacción coagulasa positiva (Jensen *et al.*, 1997). Se puede encontrar de forma normal en la piel, nariz y alrededor del recto en humanos saludables.

El crecimiento de *Staphylococcus aureus* en alimentos representa un potencial de peligro para la salud pública, ya que muchas de sus cepas producen enterotoxinas termoestables que causan envenenamiento alimentario (de Caloni y Fernández, 1983). Los alimentos que han sido contaminados post-proceso con cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénica representan un peligro significativo ya que generalmente se han removido organismos competitivos que puedan restringir el crecimiento de esta bacteria y su producción de enterotoxinas. La presencia de *Staphylococcus aureus* en los alimentos indica contaminación de la materia prima y/o contaminación post-proceso provocada por contacto humano o exposición inadecuada del alimento a superficies no higienizadas (Lancette y Bennett, 2001). En consecuencia este microorganismo es utilizado como indicador de la integridad del proceso de manufactura de los productos, ya que mide el

nivel de reintroducción de patógenos donde exista manipulación humana (Buchanan, 1991).

La fuente principal de *Staphylococcus aureus* en la carne de jueyes proviene del contacto humano. Su presencia en muchos productos incluyendo carne de jueyes lista para comer (“ready to eat”) es considerado un buen indicador de contaminación post-termal (OH *et al.*, 1992). Si este patógeno estuviera presente en el alimento y la temperatura de almacenamiento no es monitoreada, el crecimiento del microorganismo pudiera llegar hasta niveles peligrosos para la salud pública (de Caloni y Fernández, 1983).

Otro de los patógenos alimentarios de importancia es *Listeria monocytogenes*. Este es un bacilo corto, gram positivo, no formador de spora. Este microorganismo crece muy bien tanto en ambientes aerobios como anaerobios. *Listeria monocytogenes* es considerado un organismo psicrotrófico, puede crecer en ambientes que contienen hasta 10% NaCl y es acidotolerante. Esta bacteria es uno de los pocos patógenos alimentarios que pueden crecer a una actividad de agua (a_w) relativamente baja (i.e. a_w 0.90). En la identificación de este organismo se usa como característica distintiva una reacción positiva a catalasa y oxidasa negativa. Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente (suelo, cieno, agua, desagües, vegetación en descomposición y heces) (Ryser y Donnelly, 2001). *Listeria monocytogenes* se ha aislado de frutas, productos lácteos, carnes procesadas y productos marinos tales como crustáceos, moluscos y pescados tanto frescos como procesados (Poysky *et al.*, 1993; Stanley, 2004).

La presencia de *Listeria monocytogenes* en crustáceos es causa de preocupación entre consumidores, productores y agencias reguladoras (Cormier *et al.*, 1993). Estudios

recientes indican que *Listeria monocytogenes* se ha aislado de camarones, jueyes y otros crustáceos estuarinos y es más resistente que otras células vegetativas de patógenos alimentarios (Buchanan, 1991). *Listeria monocytogenes* es un patógeno que contamina pescado crudo y carne de jueyes y crece en productos marinos a temperatura de refrigeración (4°C). Es difícil de controlar la presencia de esta bacteria en el área de procesamiento lo cual permite la reintroducción de la misma al producto terminado. Esto trae como consecuencia la contaminación post-proceso (Mazzotta, 2001). La ubicuidad de *Listeria monocytogenes* en productos marinos se puede adjudicar a su capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración (4°C) y en su capacidad para sobrevivir en soluciones de salmuera y pH extremo (4.4 a 9.6) (Degnan *et al.*, 1993).

Listeria monocytogenes es una bacteria que en los últimos años ha sido vinculada frecuentemente a enfermedades transmitidas por alimentos. Se encuentra relacionada con alimentos cocidos y listos para comer como resultado de contaminación post-proceso (Ryser y Donnelly, 2001). Los síndromes que produce se conocen como listeriosis y pueden ocurrir tanto de forma epidémica como endémica. El riesgo de contraer listeriosis es mayor en alimentos contaminados que poseen un tiempo de vida (“shelf life”) útil muy largo y hay que tomar factores adicionales de seguridad en esos productos, por ejemplo quesos, cortes fríos de carnes, etc. (Farber *et al.*, 2000). Los casos de listeriosis pueden evitarse con un control adecuado de temperatura ya que esto reduce o previene el crecimiento de este patógeno alimentario.

Otro indicador de calidad microbiológica de alimentos es *Escherichia coli*. Esta bacteria es relativamente pequeña (0.5x2µm). Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, fermentador de lactosa con producción de gas. El mismo se utiliza como

indicador de contaminación fecal en agua y alimentos (Jensen *et al.*, 1997). Esta bacteria es parte de la flora normal del tracto intestinal de los humanos y de animales de sangre caliente por lo que puede crecer a temperaturas relativamente altas (44.5 a 45°C) (Frazier y Westhoff, 1988; Meng *et al.*, 2001).

Escherichia coli es un indicador de sanidad que puede indicar contaminación fecal en el alimento (de Caloni y Fernández, 1983). *Escherichia coli* también se utiliza en la industria de alimentos como un indicador de la calidad del proceso de manufactura, particularmente como indicador de la reintroducción de patógenos provenientes de fuentes ambientales. Si la presencia de *Escherichia coli* se detecta luego de la aplicación de un proceso termal adecuado al alimento, esto es indicativo de que los procesos de sanitización y control de temperatura no son los correctos (Buchanan, 1991).

En la carne de jueyes se observa más presencia de *Echerichia coli* en los pasos que preceden al proceso de manufactura del producto. En otras palabras, esto se refiere a la etapa cuando se está extrayendo la carne del crustáceo (Ingham y Moodly, 1990). La contaminación cruzada con esta bacteria ocurre luego de cocida la carne de jueyes, donde la fuente de contaminación principal es el equipo y las personas que se encuentran extrayendo la carne (OH *et al.*, 1992).

Materiales y Métodos

- **Obtención de Muestras**

Se obtuvieron las alcapurrias de jueyes (*Cardisoma guanhumí*, Latreille, 1825) de la región norte-este (Luquillo y Loíza), región este (Naguabo y Humacao) y región sur (Guayanilla y Ponce) de Puerto Rico (Figura 1). Fueron contactados 13 kioscos en esas zonas y se obtuvieron los permisos para muestreo por parte de los dueños de los mismos.



Figura 1. Mapa de las regiones de muestreo en Puerto Rico (línea roja con puntos verdes).

Las muestras recolectadas, su localización y la metodología de confección de las alcapurrias de jueyes se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Localización y metodología utilizada en los kioscos donde se llevó el muestreo a cabo

Kiosco	Localización	Masa de alcapurria	Material de envoltura
1	Luquillo	yuca - yautía	Hoja almendro
2	Loíza	yuca - yautía	Hoja uva de playa
3	Loíza	yautía	Hoja uva de playa
4	Guayanilla	yuca	Papel de aluminio
5	Ponce	yuca	Papel de aluminio
6	Humacao	guineo - yautía	Papel de aluminio
7	Humacao	guineo - yautía	Hoja uva de playa
8	Naguabo	yuca - yautía	Papel de cera
9	Humacao	guineo - yautía	Papel de cera
10	Luquillo	yuca - yautía	Papel de aluminio
11	Luquillo	yuca- yautía	Papel de cera
12	Luquillo	yuca - yautía	Papel de aluminio
13	Luquillo	yuca - yautía	Hoja almendro

Las muestras obtenidas se dividieron de acuerdo a tres variantes de proceso: cruda, cocida inmediatamente y cocida luego de 2 horas o más de haber sido frita. Se analizaron 117 muestras. Las muestras se recolectaron en bolsas estériles (Whirlpak®) debidamente identificadas, separadas por cada puesto de venta, transportadas en neveras portátiles y mantenidas en hielo picado hasta el momento del análisis. La muestra cocida de dos horas o más se mantuvo a una temperatura moderada de aproximadamente 38°C y luego se colocaron en la nevera. Se realizaron dos muestreos semestrales: uno que comprendió los meses de junio y julio y el segundo en el mes de diciembre 2003. Luego de la recolección de las muestras las mismas fueron procesadas inmediatamente a su llegada a las facilidades del laboratorio de microbiología en la Universidad de Puerto Rico en Humacao. Allí se les realizó el análisis correspondiente de contaje total y detección de los patógenos de interés (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*) (Figura 2).

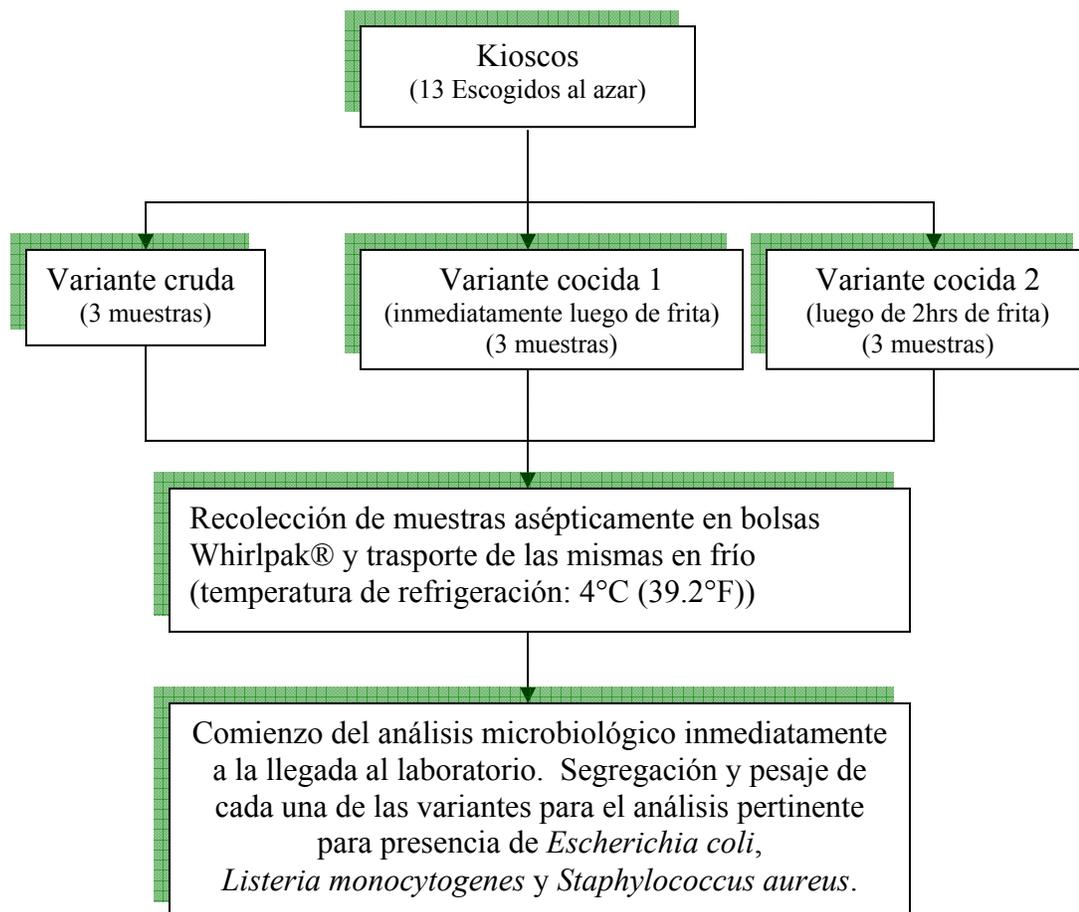


Figura 2. Diagrama de muestreo y transporte de muestras.

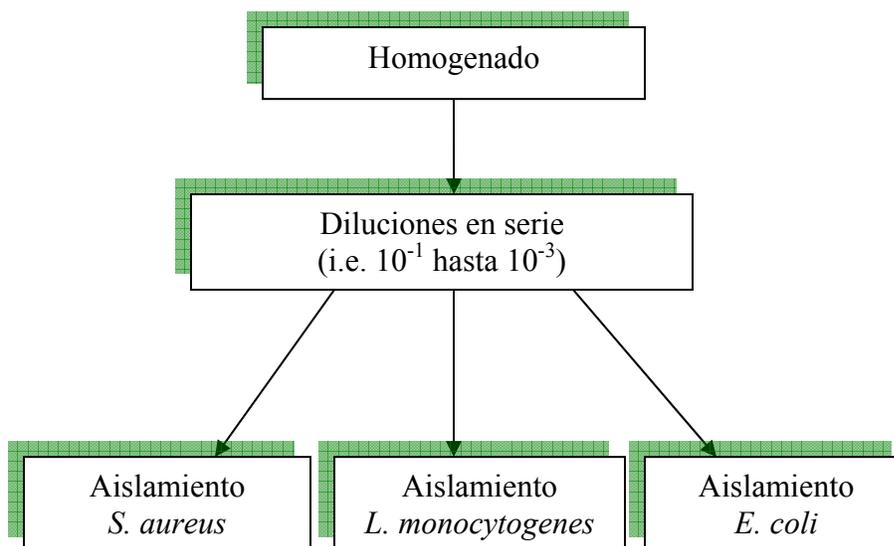


Figura 3. Diagrama de análisis de muestra.

- **Análisis de las Muestras**

Las muestras fueron analizadas para contaje total siguiendo el método de contaje de placa estándar “standard plate count” para carga microbiana y se utilizaron los métodos oficiales descritos en el “Bacteriological Analytical Manual” (BAM por sus siglas en inglés), 8va Edición (Revisión A) para el análisis de los patógenos. En adición a los métodos tradicionales para la identificación de patógenos se utilizaron dos métodos de análisis automatizados: VITEK y BIOLOG.

Siguiendo técnicas asépticas, se pesaron 25 gramos de muestra por cada una de las variantes experimentales (cruda, cocida inmediatamente y cocida luego de 2 horas o más). Dichas muestras fueron transferidas asépticamente a una bolsa de homogenización para utilizarse en el “Stomacher” (Seward, modelo 400 Circulator-230RPM). Se

añadieron 225mL de agua peptonada a las muestras y se homogenizó por 60 segundos. De cada homogenado se realizaron diluciones seriadas (i.e. 10^{-1} hasta 10^{-3}) (Figura 3).

Las diluciones seriadas fueron transferidas a placas petri tamaño estándar (100 x 15 mm) a través del método de vertido en placa “pour plate”. El análisis se corrió en duplicado.

- **Contaje Total**

Para el contaje total aeróbico las diluciones seriadas se sembraron en placas de Plate Count Agar (PCA). Las placas se incubaron por 48 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Luego se procedió a contar las colonias resultantes y se reportaron las que contenían entre 25-250 colonias (ufc/g) (Figura 3).

- **Aislamiento de *Staphylococcus aureus***

Para la detección y enumeración de *Staphylococcus aureus* se utilizaron los medios selectivos “Mannitol Salt Agar”(MSA) y “Baird Parker”(BP). Placas en duplicado de cada muestra procesada se incubaron de 24-48 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Luego se procedió a seleccionar las colonias típicas (MSA-color amarillo; BP-color negras, brillosas y con halo claro (Power y McCuen, 1988)) y atípicas (toda colonia que no presente las características anteriores). Se procedió a realizar una tinción Gram para corroborar la morfología y arreglo típico de *Staphylococcus aureus*.

Luego de la selección de las colonias se procedió a transferir las mismas a tubos de análisis con medio “Brain Heart Infusion Broth” (BHIB) y se incubaron por 24 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Con la misma aguja de inoculación se transfirieron colonias que presentaron las características anteriores al medio “Tryptic Soy Agar” (TSA) inclinado y se incubó por 48 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Luego de la incubación los tubos de BHIB se hierven por 15

minutos. Al concluir el tiempo requerido de ebullición se extrajo 0.1 mL de cada tubo y se vertieron en pozos creados en placas que contenían el medio de “Toluidine Blue-DNA Agar”(TBDNA). Se incubaron dichas placas por 4 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. La prueba positiva presentaba un halo rosa alrededor del pozo luego del periodo de incubación (BAM).

Las colonias inoculadas en TSA inclinado se inocularon en tubos de análisis que contenían caldo de glucosa y caldo de manitol. Al tubo que contenía caldo de glucosa luego de inoculado, se le añadió una capa de aceite mineral. Los tubos se incubaron por 5 días a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Para muestras positivas se presentaron cambios en color del medio en los tubos de rojo a amarillo.

La prueba de aglutinación se realizó por medio de la prueba de BACTi Staph de Remel (Latex Agglutination Test). Se requirió que las colonias fueran de cultivos frescos (18-24 horas incubadas en TSA). Se procedió a extraer colonias de las placas y colocarlas en las tarjetas de análisis. Luego se vertió el reactivo de látex sobre la muestra. Las muestras positivas presentaron formación de aglutinado del reactivo de látex inmediatamente. Se utilizó como control positivo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (Figura 3).

- **Aislamiento de *Listeria monocytogenes***

En el caso de aislamiento de *Listeria monocytogenes* las muestras se homogenizaron desde el principio añadiendo 225mL de “*Listeria* Enrichment Broth”(LEB). Los homogenizados se dejaron reposar por 24 horas en frío “cold treatment”(4°C), esto para permitir que *Listeria monocytogenes* estuviera en una forma viable y a su vez disminuir la competencia por otras poblaciones de microorganismos presentes. El paso del pre-enriquecimiento es necesario, ya que con un mínimo de 18

horas es posible determinar la presencia de *Listeria spp.* en una muestra (Cocolin *et al*, 2002). Los medios de enriquecimiento ayudan a la recuperación de las células dañadas de *Listeria spp.* y enriquecer a *Listeria spp.* y *Listeria monocytogenes* para disminuir la microflora (Asperger *et al*, 1999, Beumer *et al*, 1996, Flanders y Donnelly, 1994, Heisick *et al*, 1995 y Hitchins y Dubai, 2000).

Se prepararon placas petri estándar con los siguientes medios selectivos: Oxford Agar (OXA), Palcam Agar y McBride Agar. Luego del tratamiento en frío se procedió a estriar muestras del homogenado en los medios selectivos antes mencionados. Las placas inoculadas se procedieron a incubar entre 24-48 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Pasado el periodo de incubación se procedió a separar las colonias típicas (formación de halo negro alrededor de la colonia) y se realizó una tinción Gram para corroborar la morfología y arreglo típico de la bacteria.

Las colonias típicas se transfirieron al medio “Tryptic Soy Agar Yeast Extract” (TSAYE) y las mismas se incubaron a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ de 24 a 48 horas. Luego se realizó la prueba de catalasa (H_2O_2 al 3%). Además se realizó la prueba de motilidad, con el medio selectivo conocido como “Sulfate Indole Motility (SIM). Se utilizó como control positivo *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115) (Figura 3).

- **Aislamiento de *Escherichia coli***

A partir de los homogenizados se inocularon tubos de análisis que contenían previamente el medio “Lauryl Sulphate Tryptose Broth (LST) para realizar la prueba del número más probable (“most probable number”). Los tubos se incubaron por 24-48 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Aquellos tubos donde se detectó producción de gas, fueron separados y se consideraron positivos potenciales para coliformes. A partir de esas muestras positivas se

inocularon tubos de análisis que contenían Brilliant Green Bile Broth (BGBB), los cuales en su interior contenían un tubo “Durham” (para detectar la producción de gas). Los tubos se incubaron por 48 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A partir de los tubos que dieron positivos (producción de gas), se estriaron placas que contenían Levine’s Eosin Methylene Blue Agar (L-EMB) y se incubaron por 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Las muestras positivas mostraron crecimiento de colonias verde metálico. Se realizó una tinción Gram para corroborar la morfología y arreglo típico de *Escherichia coli*.

Estas colonias fueron reinoculadas en tubos de análisis con caldo lactosado conteniendo en su interior tubos “Durham” (mide producción de gas). Los tubos se incubaron por 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A las muestras que resultaron positivas se les realizó la prueba miniaturizada de API 20E. Se utilizó como control positivo *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Figura 3).

- **Preparación de muestra para métodos automatizados de identificación: VITEK y BIOLOG**
- **VITEK**

Se utilizó el sistema automatizado de VITEK (modelo mini VITEK serie Junior, McDonnell Douglas) para identificar las bacterias de estudio.

a. Cocos Gram Positivos y otros organismos Gram Positivos Aislados

Los microorganismos a ser identificados provinieron de cultivos puros, incubados por 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ en “Trypticase Soy Agar” (TSA).

Se tomó un inóculo del cultivo puro y se realizó una tinción Gram para corroborar la morfología. Se realizó la prueba de catalasa. Al esta prueba ser positiva se procedió a marcar la depresión #31 en la tarjeta de **VITEK GPI**. En adición se procedió a realizar

la prueba de coagulasa para cocos Gram positivos catalasa positiva. Las pruebas que resultaron positivas se procedió a marcar en la tarjeta de **VITEK GPI** la depresión # 32.

Se procedió a preparar la suspensión bacteriana de las muestras que se sometieron a esta prueba. La suspensión tuvo un patrón de turbidez de 0.5 de McFarland y las células fueron suspendidas uniformemente. La transferencia de los cultivos a dichos tubos fue mediante técnicas asépticas. Se procedió a colocar las tarjetas y la suspensión de células para la transferencia desde el tubo de análisis a la tarjeta mediante la acción de vacío. Este proceso no debe pasar más de 20 minutos en la preparación de la suspensión e incubación. Luego de haber realizado este paso las tarjetas se introdujeron dentro del sistema automatizado de VITEK para incubación y lectura.

b. Organismos gram negativos

Para la identificación de *Enterobacteriaceae*, los inóculos procedieron de cultivos en L-EMB de no más de 24 horas. Se tomó un inóculo del cultivo puro y se realizó una tinción Gram para corroborar la identificación morfológica. Se realizó la prueba de catalasa. Se seleccionó una colonia y se realizó la prueba de oxidasa, al la prueba dar positiva se ennegreció la depresión #31 de la tarjeta de **VITEK GNI**.

Se preparó la suspensión bacteriana la cual tuvo un patrón de turbidez no. 1 de McFarland. La transferencia de los cultivos a dichos tubos fue mediante técnicas asépticas. Se procedió a colocar las tarjetas y la suspensión de células para la transferencia de la suspensión desde el tubo de análisis a la tarjeta mediante la acción de vacío. Este proceso no debe pasar más de 20 minutos en la preparación de la suspensión e incubación. Luego de haber realizado este paso las tarjetas se introdujeron dentro del sistema automatizado de VITEK para incubación y lectura.

- **BIOLOG**

El sistema automatizado utilizado fue Biolog Microstation Plate Reader/Microlog 3.

Para realizar esta prueba automatizada las muestras se transfirieron al medio “Biolog Universal Growth” (BUG +B). Este medio se utilizó para el crecimiento de las bacterias Gram negativo y Gram positivo. Los cultivos fueron incubados por 24 horas a 35 ± 2 °C. Las bacterias que fueron Gram negativos se les realizó la prueba de oxidasa y las bacterias Gram positivas se les realizó la prueba de catalasa (H_2O_2 al 3%).

Luego de haber realizado pruebas preeliminares, se procedió a preparar la suspensión bacteriana. Esta se realizó con solución salina al 0.85%. Se colocó la misma en los tubos de análisis y se esterilizaron. La transferencia de los cultivos a dichos tubos fue mediante técnicas asépticas. Para bacterias Gram negativas entéricas se utilizó un nivel de turbidez de 52% (± 2) de transmitancia. En el caso de las bacterias cocos Gram positivos el nivel de turbidez fue de 20% (± 2) de transmitancia. En el caso de los bacilos Gram positivos el nivel de turbidez fue de 28% (± 2) de transmitancia.

Se procedió a llenar los microplatos. Cada microplato es específico para cada una de las morfologías presentadas. Se realizó el llenado de los microplatos para bacterias Gram positivas (GP-COC), Gram negativas (GN-ENT) y para Bacilos Gram positivos (GP-ROD). Luego se incubaron de 16-24 horas a 35-37°C. Luego de la incubación se procedió a colocar los microplatos en el sistema automatizado para la lectura correspondiente. La identificación se realizó de acuerdo a la matriz que acompaña al instrumento.

- **Análisis Estadístico**

Para las pruebas de múltiples muestras se recomienda análisis de varianza (ANOVA) Modelo II, la cual emplea la prueba estadística F. Esta prueba ayuda a comparar las diferencias cuando hay más de dos medias (Brower *et al*, 1997). En el caso de este trabajo hay tres medias diferentes y se comparó la biomasa bacteriana en las tres variantes experimentales antes mencionadas (cruda, cocida 1 y cocida 2). Para la comparación de la densidad microbiana en la aislación de *Staphylococcus aureus* se utilizó la prueba estadística de ANOVA Modelo I. También se utilizaron tablas de contingencia para la comparación entre los diferentes métodos de recuperación de patógenos por variante experimental. Se añadió la prueba estadística “Goodness of Fit” o prueba de ajuste, esto para observar la eficiencia de cada medio selectivo por separado al momento de la recuperación de heterotrofos cultivables, en este caso el patógeno de interés.

Resultados

- **Contaje Total**

Se utilizó el medio de cultivo PCA para determinar la densidad de heterotrófos cultivables. La data recopilada para esta prueba se puede apreciar en la Tabla 2 y Figura 4. Los resultados obtenidos indican una proporción de mayor densidad de bacterias heterotróficas en las muestras crudas. Los kioscos que presentaron mayor carga microbiana fueron el 4 y 6. Mientras los kioscos 7, 8 y 9 demostraron una carga microbiana de 10^{-2} cfu/g. Al someter las muestras crudas a calor se observó una disminución significativa en la carga microbiana. No se observó una diferencia significativa entre los contajes bacterianos inmediatamente luego de freír las muestras (cocida 1) y el contaje obtenido luego de haber transcurrido dos horas o más de cocido (cocida 2), con excepción de las muestras de los kioscos 4 y 5. En estas últimas se observó un ligero aumento en densidad bacteriana luego del periodo de cocimiento.

Se utilizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA Modelo II) para comparar la carga microbiana en las tres etapas de procesamiento ya mencionada (Tabla 3). Los resultados demostraron que existe diferencia significativa en la carga microbiana entre los diferentes tratamiento.

Tabla 2. Densidad de heterotrofos promedio de muestras de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Kiosco	Contaje en PCA cfu/g					
	Cruda	ES (±)	Cocida1	ES (±)	Cocida2	ES (±)
1	184,000	3,000	3,600	1,000	1,650	150
2	40,000	7,500	50	20	<10est**	0.5
3	50,000	4,500	110	40	<10est**.	1
4	840,000est.*	0	1,500	25	2,000	135
5	90,000	4,500	430	10	1,700	20
6	784,000est*	0	<10est.**	0	<10est.	0
7	400	30	95	25	45	5
8	600	195	<10est.**	0	<10est.**	0
9	300	25	25	15	25	5
10	170,000	2,000	<10est.**	0	<10est.**	0
11	400,000	11,000	<10est.**	0	<10est.**	0
12	320,000	9,000	<10est.**	0	<10est.**	0
13	310,000	29,500	<10est.**	0	20	0

Nota:

* Regla 7 (15 cfu/g por cm²) "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" 4th Ed. APHA

** Regla 6 (0 cfu/g) "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" 4th Ed. APHA

ES = error estándar

Figura 4. Densidad promedio de heterotrofos cultivables en 13 kioscos en Puerto Rico.

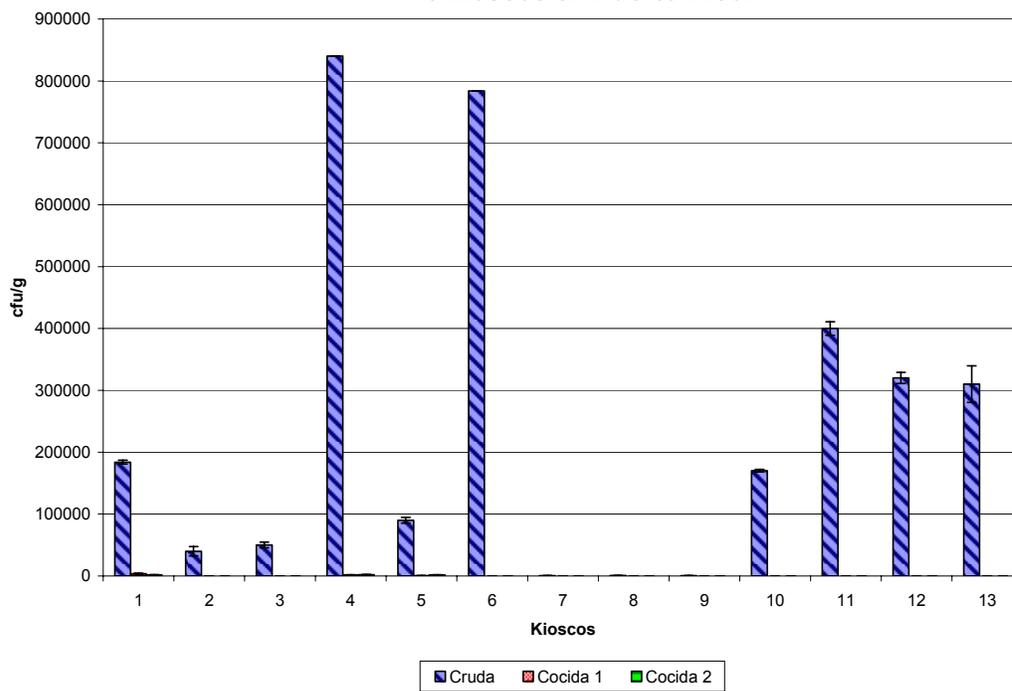


Tabla 3. Análisis Estadístico (ANOVA) Modelo II sobre la densidad de heterotrofos promedio de muestras de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Fuente	SS	DF	MS
Total	1.48 x 10 ¹²	38	
Entre grupos de variantes	5.19 x 10 ¹¹	2	2.59 x 10 ¹¹
Error	9.61 x 10 ¹¹	36	2.66 x 10 ¹⁰

SS=suma de cuadrados

DF=grados de libertad

MS=media de cuadrados

F= 9.74

F_{0.05 (2,36)} = 3.27

Se rechaza H₀; En consecuencia hay diferencia en la carga microbiana entre los diferentes tratamientos (variantes).

- **Aislación de *Staphylococcus aureus***

En las pruebas para la detección de *Staphylococcus aureus* se utilizaron dos medios de cultivo selectivos: “Mannitol Salt Agar” (MSA) y “Baird Parker” (BP). Los resultados obtenidos para MSA se observan en la Tabla 4 y Figura 5 . El kiosco 4 fue el establecimiento con mayor densidad de *Staphylococcus aureus* en la variante cruda. Luego del tratamiento de calor hubo una disminución de la bacteria. Los resultados en el medio de BP se pueden observar en la Tabla 5 y Figura 6. Al igual que el medio MSA, el kiosco con mayor carga microbiana en la variante cruda lo fue el kiosco 4. Nuevamente la cocción del producto provocó una disminución de *Staphylococcus aureus*.

Se utilizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA Modelo I) para comparar los resultados obtenidos en las tres variantes experimentales. En las Tablas 6 y 7 se presentan el análisis estadístico para los resultados obtenidos en MSA y BP respectivamente. Los resultados demostraron que no existe diferencia significativa entre las variantes experimentales y la densidad de *Staphylococcus aureus* cultivables al momento de su recuperación de la muestra.

Se realizó la prueba estadística “Goodness of Fit” para determinar el perfil de recuperación de *Staphylococcus aureus* por cada variante en los medios de MSA y BP. Los resultados se pueden observar en las Tablas 8 y 9 respectivamente. La frecuencia observada fue mayor en la variante cruda. Estos resultados reflejaron un valor ($X^2=2,536,485$) para MSA mientras que para BP el valor obtenido fue ($X^2=2,390,805$). Por consiguiente, se acepta H_a , hay diferencia significativa en la recuperación del patógeno para ambos medios en las alcapurrias de jueyes.

Tabla 4. Resultados promedios para la presencia de *Staphylococcus aureus* tomada del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Kiosco	Contaje en MSA cfu/g					
	Cruda	ES (±)	Cocida1	ES (±)	Cocida2	ES (±)
1	900	50	60	5	40	5
2	300	50	10**	0	10**	0
3	400	0	20	5	10**	0
4	840000*	0	10**	0	10**	0
5	20000	300	10**	0	180	0
6	130000	2000	10**	0	10**	0
7	1200	30	20	0	10**	0
8	1000	30	10**	0	10**	0
9	3500	100	10**	0	10	0
10	140000	2500	10**	0	10**	0
11	30000	110	10**	0	10**	0
12	10000	200	10**	0	10**	0
13	2000	100	10**	0	10**	0

Nota:

* Regla 7 (15 cfu/g por cm²) “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” 4th Ed. APHA

** Regla 6 (0 cfu/g) “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods” 4th Ed. APHA

MSA= Mannitol Salt Agar

ES = error estándar

Figura 5. Densidad promedio de *Staphylococcus aureus* en el medio MSA para alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.

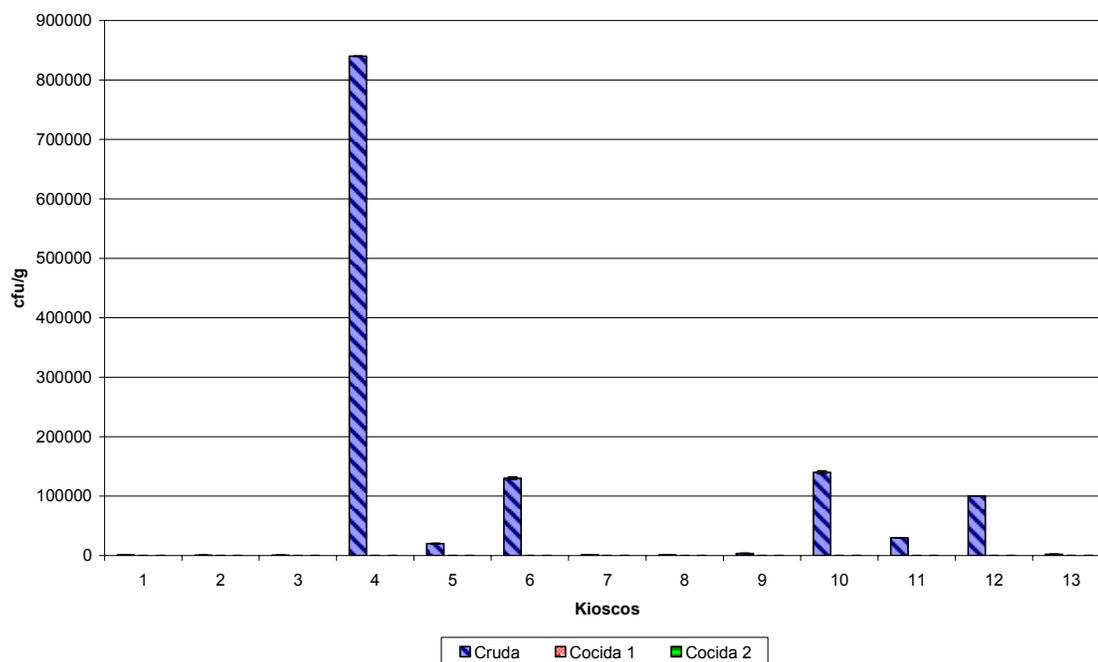


Tabla 5. Resultados promedios para la presencia de *Staphylococcus aureus* en el medio BP para alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Kiosco	Contaje en BP cfu/g					
	Cruda	ES (±)	Cocida1	ES (±)	Cocida2	ES (±)
1	800	50	70	0	30	5
2	200	50	10**	0	10**	0
3	300	50	20	0	10**	0
4	840000*	0	10**	0	90	5
5	20000	300	110	10	120	5
6	70000	4000	10	0	10**	0
7	1000	70	20	5	10**	0
8	1300	75	10**	0	10**	0
9	1100	50	10**	0	10	0
10	2000	300	10**	0	10**	0
11	120000	1000	10**	0	10**	0
12	100000	2500	10**	0	10**	0
13	40000	1000	10**	0	10**	0

Notas:

* Regla 7 (15 cfu/g por cm²) "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" 4th Ed. APHA

** Regla 6 (0 cfu/g) "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods" 4th Ed. APHA

BP = Baird-Parker Agar

ES = error estándar

Figura 6. Densidad promedio de *Staphylococcus aureus* en el medio BP para alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.

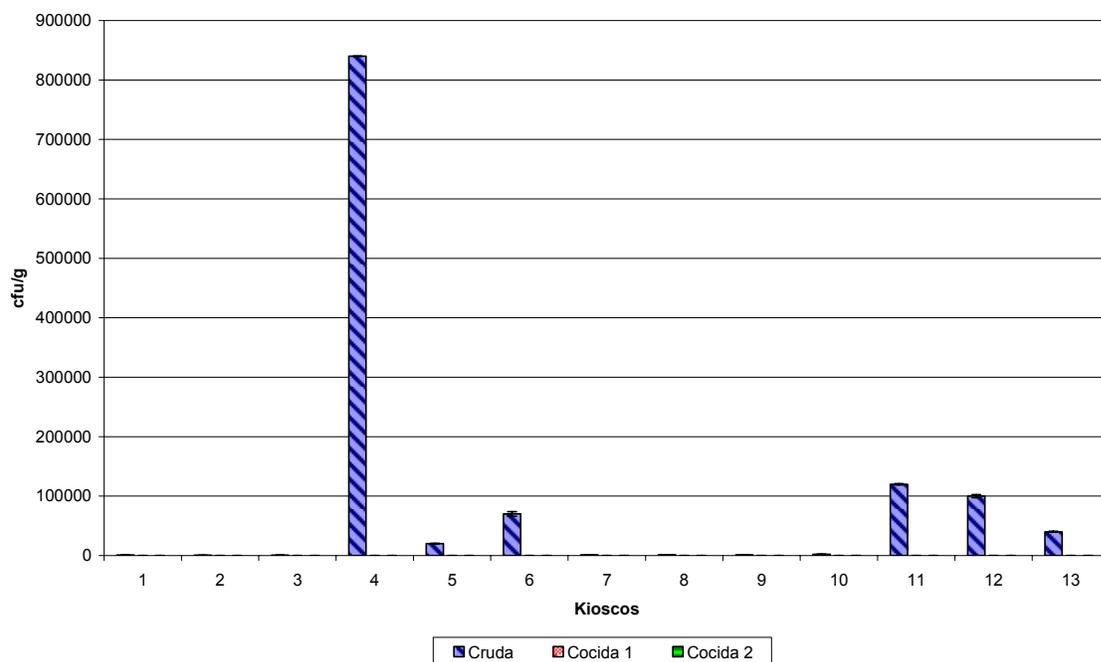


Tabla 6. Análisis Estadístico (ANOVA) Modelo I sobre los resultados del medio MSA en las muestras de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Fuente	SS	DF	MS
Total	7.07×10^{11}	38	
Entre grupos de variantes	7.04×10^{10}	2	3.52×10^{10}
Error	6.36×10^{11}	36	1.76×10^{10}

SS=suma de cuadrados

DF=grados de libertad

MS= media de cuadrados

F= 2.02

$F_{0.05 [2,36]} = 3.27$

Se acepta H_0 ; no hay diferencia en la recuperación de la carga microbiana entre los diferentes tratamientos (variantes).

Tabla 7. Análisis Estadístico (ANOVA) Modelo I sobre los resultados del medio BP en las muestras de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Fuente	SS	DF	MS
Total	2.74×10^{12}	38	
Entre grupos de variantes	7.33×10^{10}	2	3.66×10^{10}
Error	2.66×10^{12}	36	7.38×10^{10}

SS=suma de cuadrados

DF=grados de libertad

MS=media de cuadrados

F= 0.968

$F_{0,05 [2,36]} = 3.27$

Se acepta H_0 , no hay diferencia en la recuperación de la carga microbiana entre los diferentes tratamientos (variantes).

Tabla 8. Prueba de ajuste “Goodness of Fit” para resultados en MSA

Variante	Frecuencia Observada (f)	Frecuencia Esperada (F)
Cruda	1,269,300	423,276
Cocida 1	200	423,276
Cocida 2	330	423,276

$X^2 = 2,536,485$

$\alpha_{0,05} = 5.991$, Se rechaza la H_0 , ya que $2,536,485 > 5.991$. Se concluye que el medio de MSA es efectivo al momento de la recuperación del patógeno.

Tabla 9. Prueba de ajuste “Goodness of Fit” para resultados en BP

Variante	Frecuencia Observada (f)	Frecuencia Esperada (F)
Cruda	1,196,700	399,116
Cocida 1	310	399,116
Cocida 2	340	399,116

$X^2 = 2,390,805$

$\alpha_{0,05} = 5.991$, Se rechaza la H_0 , ya que $2,390,805 > 5.991$. Se concluye que el medio de BP es efectivo al momento de la recuperación del patógeno.

Tabla 10. Análisis de tablas de contingencia para la diferencia entre los perfiles de recuperación de *Staphylococcus aureus* en los medios MSA y BP

	Cruda	Cocida 1	Cocida2	Total
MSA	1,269,300	200	330	1,269,830
BP	1,196,700	310	340	1,197,350
Total	2,466,000	510	670	2,467,180

$$X^2 = 31.58$$

$\alpha_{0.05} = 5.991$, Se rechaza la H_0 , ya que $31.58 > 5.991$. El tratamiento de calor afecta la recuperación de *Staphylococcus aureus*. Se llega a la conclusión de que no existen diferencias significativas en los medios selectivos de MSA y BP al momento de la recuperación del patógeno.

La Tabla 10 muestra una tabla de contingencia para determinar la diferencia en la recuperación de *Staphylococcus aureus* en los medios MSA y BP por tipo de tratamiento. El valor obtenido fue ($X^2 = 31.58$). La cantidad de bacterias cultivables está estrechamente vinculada a la variante de procesamiento de la muestra. Los resultados de esta prueba sugieren que no existe diferencia significativa en la utilización de un medio u otro (i.e. MSA vs. BP) al momento de la recuperación del patógeno del alimento.

Aquellas muestras que mostraron la presencia de *Staphylococcus aureus* se sometieron a pruebas de aglutinación y termonucleasa. En 6 de los 13 kioscos (46%) se encontraron resultados positivos para ambas pruebas (Tabla 11).

Se utilizaron dos métodos automatizados de identificación bacteriana (VITEK y BIOLOG) para confirmar la identidad de las cepas de *Staphylococcus aureus* recuperadas de los medios MSA y BP. Los resultados presentados en la Tabla 12 se desprende que no hay correspondencia entre la forma tradicional de identificación y los métodos alternos que se emplearon. Ninguna de las cepas recuperadas en MSA y BP fueron identificadas

como *Staphylococcus aureus*, inclusive el sistema de identificación rápida VITEK falló en la identificación correcta de la cepa control de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 11. Resultados positivos mediante el método tradicional para la identificación de *Staphylococcus aureus* tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Kiosco	Identificación Tradicional (Termonucleasa)	Identificación Tradicional (Agglutinación)	Identificación Tradicional (Manitol)
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
2	-	-	-
3	-	-	-
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
5	-	-	-
6	-	-	-
7	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
Control Positivo ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Tabla 12. Resultados positivos mediante métodos automatizados para la identificación de *Staphylococcus aureus* tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Kiosco	Identificación Rápida (VITEK)	Identificación Rápida (BIOLOG)
1	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
4	No ID	<i>Staphylococcus spp.</i>
7	No ID	<i>Pediococcus acidilactici/parvulus</i>
8	No ID	No ID
9	<i>Enterococcus faecalis</i>	No ID
10	<i>Staphylococcus spp.</i>	No ID
Control Positivo ATCC 25923	No ID	<i>Staphylococcus aureus</i>

- **Aislación de *Listeria monocytogenes***

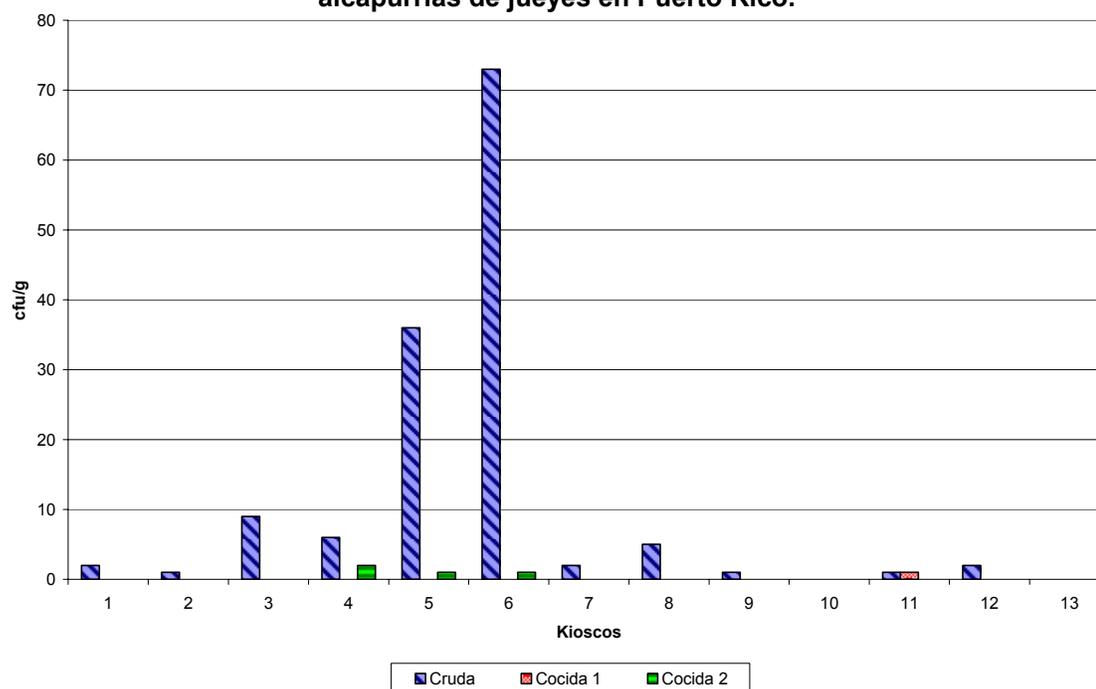
Se utilizaron tres medios selectivos para la recuperación de *Listeria monocytogenes* los cuales fueron Oxford, Palcam y McBride. Las densidades de *Listeria monocytogenes* en las muestras representativas de las tres etapas de procesamiento fueron bajas, se pueden observar los resultados en las Tablas 13, 14 y 15 y en las Figuras 7, 8 y 9. La bacteria queda eliminada en su totalidad al aplicar calor, como lo refleja la data recopilada para las variantes experimentales cocida 1 y cocida 2. Los resultados obtenidos para el medio de Oxford se pueden observar en la Tabla 12. Estos reflejan que la variante cruda fue la etapa donde se reflejó con más agresividad *Listeria monocytogenes*, especialmente en los kioscos 5 y 6. Se puede observar esta tendencia en

la Figura 7. Las variantes cocida 1 y cocida 2, registraron una presencia mínima de este patógeno. La aplicación de calor redujo significativamente la presencia de la bacteria.

Tabla 13. Resultados promedios para la presencia de *Listeria monocytogenes* en el medio Oxford tomada del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Kiosco	Contaje en Oxford cfu/g		
	Cruda	Cocida1	Cocida2
1	2	0	0
2	1	0	0
3	9	0	0
4	6	0	2
5	36	0	1
6	73	0	1
7	2	0	0
8	5	0	0
9	1	0	0
10	0	0	0
11	1	1	0
12	2	0	0
13	0	0	0

Figura 7. Presencia de *Listeria monocytogenes* en el medio Oxford en alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.

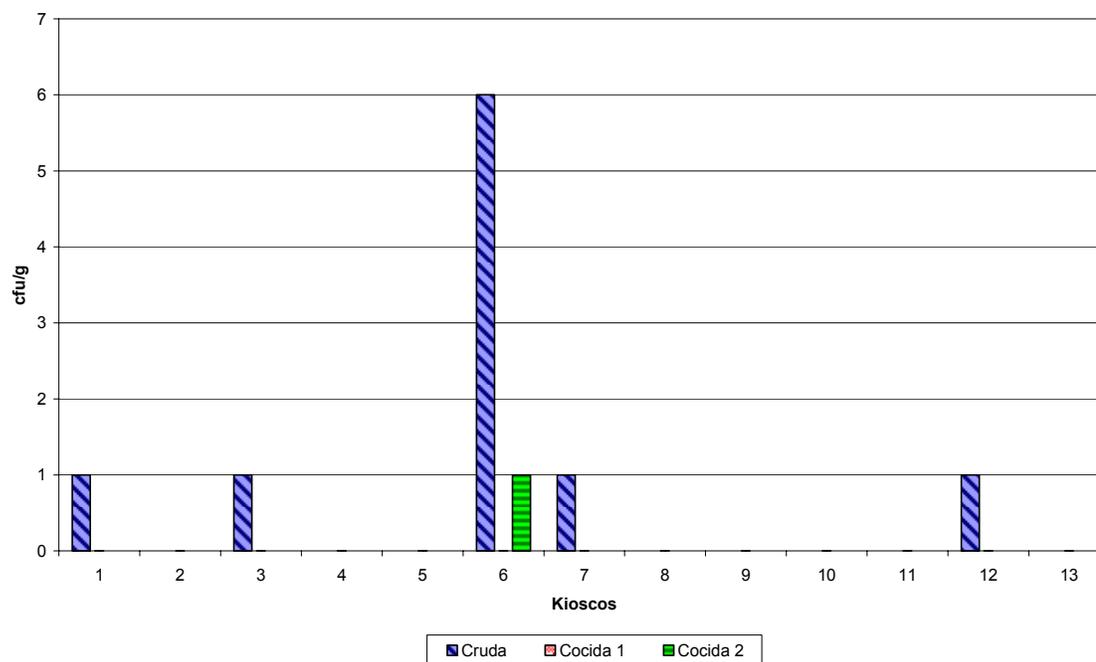


En la Tabla 14 se observan los resultados obtenidos para la recuperación de *Listeria monocytogenes* en el medio selectivo de Palcam. La recuperación de *Listeria monocytogenes* fue mínima. El 80% de las muestras positivas fueron en la variante cruda. Se aisló la bacteria de las muestras de los kioscos 1, 3, 6, 7 y 12, encontrándose la mayor densidad en el kiosco 6. Estos resultados se pueden observar en la Figura 8.

Tabla 14. Resultados promedios para la presencia de *Listeria monocytogenes* en el medio Palcam tomada del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Kiosco	Contaje en Palcam cfu/g		
	Cruda	Cocida1	Cocida2
1	1	0	0
2	0	0	0
3	1	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	6	0	1
7	1	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	1	0	0
13	0	0	0

Figura 8. Presencia de *Listeria monocytogenes* en medio Palcam tomada del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.



En la Tabla 15 se observa los resultados de la recuperación de *Listeria monocytogenes* en el medio selectivo McBride. Prácticamente la recuperación de *Listeria monocytogenes* fue mínima, solo 3 kioscos registraron muestras positivas. Estos fueron los kioscos 7, 10 y 12. Estos resultados se pueden observar en la Figura 9. Las recuperaciones fueron en la variante cruda.

Tabla 15. Resultados promedios para la presencia de *Listeria monocytogenes* en el medio McBride tomada del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Kiosco	Contaje en McBride cfu/g		
	Cruda	Cocida1	Cocida2
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	1	0	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	1	0	0
11	0	0	0
12	1	0	0
13	0	0	0

Figura 9. Presencia de *Listeria monocytogenes* en el medio McBride tomada del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.

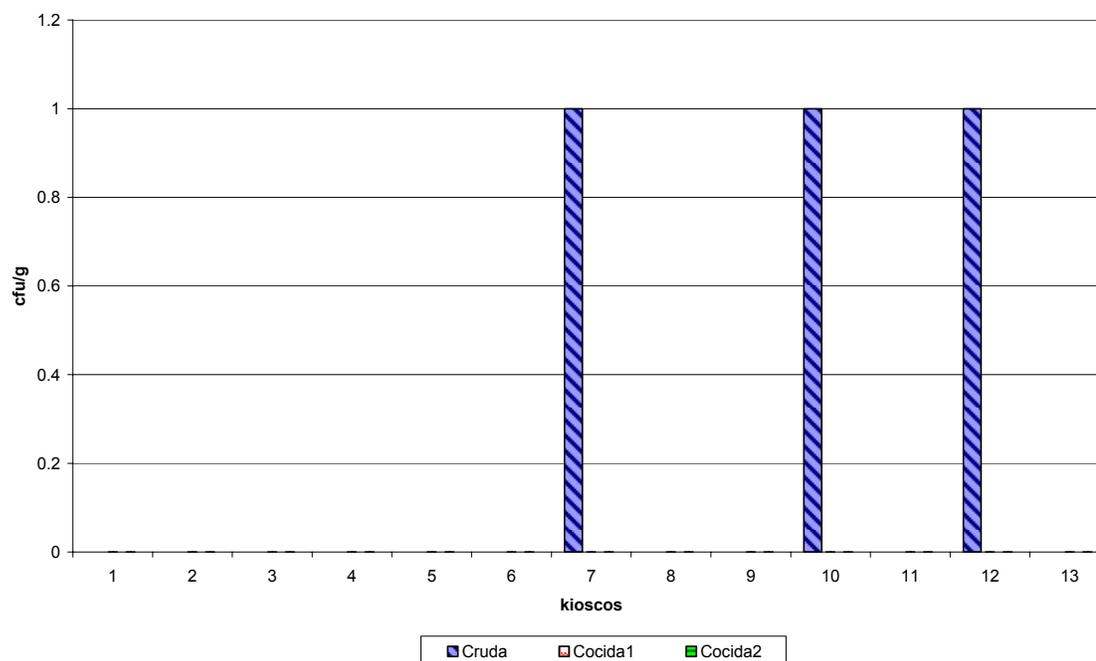


Tabla 16. Prueba de ajuste “Goodness of Fit” para resultados en Oxford

Variante	Frecuencia Observada (f)	Frecuencia Esperada (F)
Cruda	138	47.6
Cocida 1	1	47.6
Cocida 2	4	47.6

$$X^2 = 257.23$$

$\alpha_{0.05} = 5.991$, Se rechaza la H_0 , ya que $257.23 > 5.991$. Se concluye que el medio de Oxford es efectivo al momento de la recuperación del patógeno.

Tabla 17. Prueba de ajuste “Goodness of Fit” para resultados en Palcam

Variante	Frecuencia Observada (f)	Frecuencia Esperada (F)
Cruda	10	3.6
Cocida 1	0	3.6
Cocida 2	1	3.6

$$X^2 = 13.24$$

$\alpha_{0.05} = 5.991$, Se rechaza la H_0 , ya que $13.24 > 5.991$. Se concluye que el medio de Palcam es efectivo al momento de la recuperación del patógeno.

Se realizó una prueba “Goodness of Fit” para determinar la carga microbiana en cada medio (Tablas 16 y 17). Esta prueba estadística reflejó que la frecuencia observada fue dominada por la variante cruda. El valor fue de ($X^2 = 257.23$). Se acepta la H_a , el medio Oxford es adecuado para la recuperación de *Listeria monocytogenes*. Hay diferencia significativa entre las diferentes variables experimentales. En el caso de Palcam el valor de la prueba fue de ($X^2 = 13.24$). Se desprende de este resultado que el medio Palcam es una alternativa para aislar *Listeria monocytogenes* de las alcapurrias de jueyes. Se acepta la H_a , la diferencia significativa se encuentra en las variantes.

La prueba de “Goodness of fit” para el medio McBride no se llevó a cabo ya que la prueba no acepta ceros, como se observa en los datos recopilados en la Tabla 14. Los ceros en esta prueba reducen el poder de la misma.

Tabla 18. Análisis de tablas de contingencia para la diferencia entre los perfiles de recuperación de *Listeria monocytogenes* en los medio Oxford, Palcam y McBride

	Cruda	Cocida 1	Cocida 2	Total
Oxford Agar	137.603	4.496	1.798	143.897
Palcam Agar	10.584	0.345	0.138	11.067
McBride Agar	4.811	0.157	0.062	5.030
Total	152.998	4.998	1.988	159.994

$$X^2 = 6.35$$

$\alpha_{[4,0.05]} = 9.488$, Se acepta la hipótesis nula debido a que $6.352 < 9.488$. Se concluye que existe diferencia entre los medios Oxford Agar, Palcam Agar y McBride Agar al momento de recuperar *Listeria monocytogenes* de una muestra relacionada con alimentos.

Se realizó un análisis estadístico de tabla de contingencia para la comparación entre los perfiles de recuperación bacteriana en los medios selectivos de Oxford, Palcam y McBride, reflejan que hubo diferencia significativa en la recuperación de *Listeria monocytogenes* de las muestras experimentales. La efectividad de recuperación de los medios varía entre sí. Se registró una mayor recuperación en el medio Oxford.

Tabla 19. Resultados positivos mediante el método tradicional para la identificación de *Listeria monocytogenes* tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Kiosco	Identificación Tradicional (SIM)	Identificación Tradicional (Catalasa)
1	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
6	-	-
7	-	-
8	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
9	-	-
10	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
11	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
12	-	-
13	-	-
Control Positivo ATCC 19115	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>

Tabla 20. Resultados positivos mediante métodos automatizados para la identificación de *Listeria monocytogenes* tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Kiosco	Identificación Rápida (VITEK)	Identificación Rápida (BIOLOG)
1	No ID	No ID
5	<i>Streptococcus uberis</i>	No ID
8	No ID	No ID
10	No ID	No ID
11	No ID	No ID
Control Positivo ATCC 19115	No ID	<i>Listeria monocytogenes</i>

Se utilizaron dos métodos automatizados de identificación bacteriana (VITEK y BIOLOG) para confirmar la identidad de las cepas de *Listeria monocytogenes* recuperadas de los medios Oxford, Palcam y McBride. Los resultados presentados en la Tablas 19 y 20 se desprende que no hay correspondencia entre la forma tradicional de identificación y los métodos alternos que se emplearon. Ninguna de las cepas recuperadas en dichos medios fueron identificadas como *Listeria monocytogenes*, inclusive el sistema de identificación rápida VITEK falló en la identificación correcta de la cepa control de *Listeria monocytogenes*.

- **Enumeración de *Coliformes* fecales**

Se utilizó el método de número más probable (NMP) para estimar los números de *coliformes* fecales, ver Tabla 21 y Figura 10 se obtuvieron los niveles de *coliformes* en las muestras experimentales. Las densidades más altas de *coliformes* se reflejaron en la variante cruda. El tratamiento de calor redujo estas densidades.

Para confirmar la presencia de *Escherichia coli*, en el medio selectivo “Levine’s eosin-methylene blue agar” (EMB) se realizaron las pruebas miniaturizadas de API 20 E. Dichas cepas fueron identificadas como *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella planticola* (Tabla 22), cabe señalar que las muestras que se procesaron a través de los métodos rápidos de VITEK y BIOLOG no pudieron ser identificadas por los mismos (Tabla 23). Ninguna de las cepas recuperadas en dichos medios fueron identificadas como *Escherichia coli*, inclusive los sistemas de identificación rápida VITEK y BIOLOG fallaron en la identificación correcta de la cepa control de *Escherichia coli*.

Tabla 21. Resultados de coliformes fecales para la prueba del número más probable (NMP) tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Kiosko	Valor Reportado			NMP est./g					
	Cruda	Cocida1	Cocida2	Cruda	ES (±)	Cocida1	ES (±)	Cocida2	ES (±)
1	3-3-3	0-0-0	0-0-0	>1100	0	< 3.0	0	< 3.0	0
2	3-3-1	0-0-0	0-0-0	460	0.65	< 3.0	0	< 3.0	0
3	3-3-3	0-0-0	0-0-0	>1100	0	< 3.0	0	< 3.0	0
4	3-1-0	0-0-0	0-0-0	43	0.87	< 3.0	0	< 3.0	0
5	3-1-0	0-0-0	0-0-0	43	0.87	< 3.0	0	< 3.0	0
6	3-3-3	0-0-0	0-0-0	>1100	0	< 3.0	0	< 3.0	0
7	1-0-0	0-0-0	0-0-0	3.6	0.3	< 3.0	0	< 3.0	0
8	3-1-1	0-0-0	0-0-0	75	0.65	< 3.0	0	< 3.0	0
9	3-0-1	0-0-0	0-0-0	38	0.87	< 3.0	0	< 3.0	0
10	3-3-1	0-0-0	0-0-0	460	0.65	< 3.0	0	< 3.0	0
11	3-3-3	0-0-0	0-0-0	>1100	0	< 3.0	0	< 3.0	0
12	3-3-3	0-0-0	0-0-0	>1100	0	< 3.0	0	< 3.0	0
13	3-3-0	0-0-0	0-0-0	240	1	< 3.0	0	< 3.0	0

Figura 10. Resultados de coliformes fecales para la prueba NMP tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico.

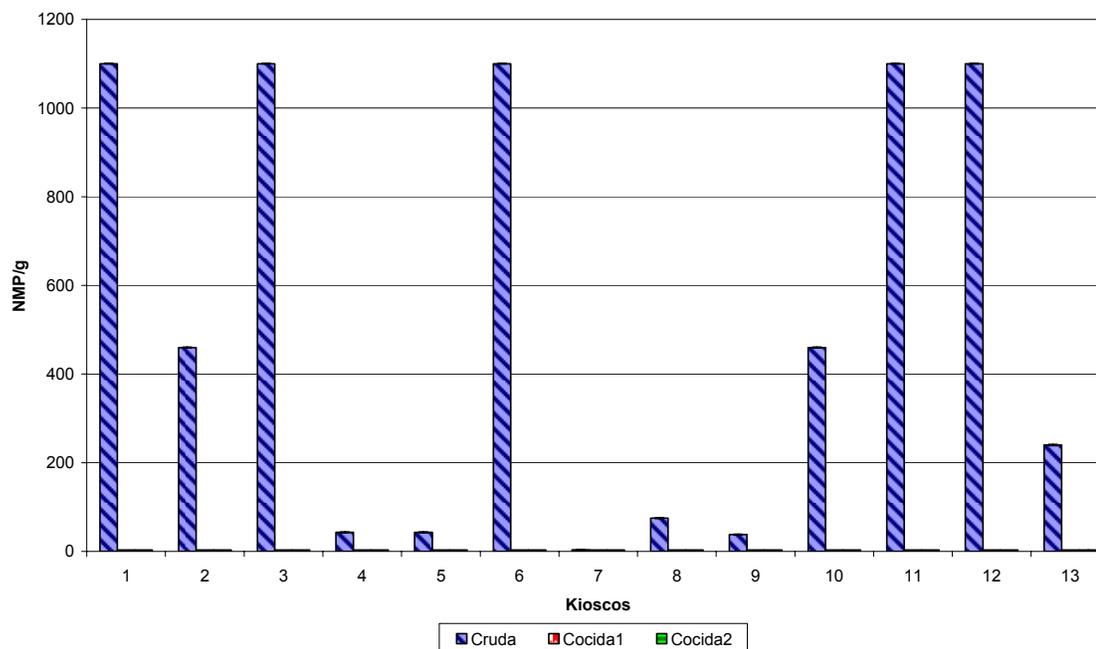


Tabla 22. Resultados positivos mediante el método tradicional para la identificación de *Escherichia coli* tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Kiosco	Identificación Tradicional (EMB AGAR) API 20E
1	-
2	-
3	-
4	<i>Serratia marcescens</i>
5	<i>Klebsiella planticola</i>
6	<i>Serratia marcescens</i>
7	-
8	-
9	-
10	-
11	-
12	<i>Klebsiella planticola</i>
13	<i>Serratia liquefaciens</i>
Control Positivo ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>

Tabla 23. Resultados positivos mediante métodos automatizados para la identificación de *Escherichia coli* tomados del muestreo de alcapurrias de jueyes en Puerto Rico

Kiosco	Identificación Rápida (VITEK)	Identificación Rápida (BIOLOG)
4	No ID	No ID
5	No ID	No ID
6	No ID	No ID
12	No ID	No ID
13	No ID	No ID
Control Positivo ATCC 25922	No ID	No ID

Discusión

El estudio realizado presenta diferencias en la densidad de bacterias heterotróficas cultivables en las muestras crudas de alcapurrias de diferentes kioscos. Los kioscos 4 y 6 mostraron contajes de más de 500,000 bacterias por gramo de producto, sin embargo, muestras similares obtenidas de los kioscos 7, 8 y 9 arrojaron resultados en orden de 10^2 . Estas diferencias podrían ser provocadas por varios factores: materiales utilizados en la envoltura del producto, forma de confeccionar el producto, manejo de la materia prima y condición general del área de confección del producto. En el caso de los kioscos 4 y 6, las alcapurrias crudas se envolvían con papel aluminio. En los kioscos 7, 8 y 9, las alcapurrias crudas se envolvían con hoja de uva de playa y papel de cera respectivamente.

Las alcapurrias se confeccionaron a temperatura ambiente en todos los kioscos. Las áreas de los kioscos 4 y 6 eran de Guayanilla y Humacao. Las áreas de los kioscos, 7, 8 y 9 eran de Humacao, Naguabo y Humacao respectivamente. La materia prima para preparar las alcapurrias variaba en cuanto a ingredientes. Habían alcapurrias confeccionadas solo de yuca (kioscos 4 y 5), de mezcla de yuca y yautía (kioscos 1,2,8,10,11,12 y13), de mezcla de yautía y guineo (kioscos 6,7 y 9) y de yautía solamente (kiosco 3), mezclas coloreadas con achiote (kioscos 2,3,4,5,6,7 y 9) o Bijoul (kioscos 1, 8,10,11,12 y 13); En adición las alcapurrias se rellenaban con carne jueyes o con una mezcla de jueyes y cocolías (*Callinectes bocourti*).

En todos los kioscos se freían las alcapurrias de jueyes en aceite vegetal (no manteca). Dada esas diferencias en la confección del producto se hace importante el dato de los kioscos 7, 8 y 9 que mostraron una carga microbiana mínima en las muestras crudas.

Independientemente del manejo inicial y confección de las muestras crudas, una vez se someten a calor al freírlas (cocida 1), se reduce significativamente la densidad microbiana en todas las muestras (Tabla 1). Aún cuando este dato apunta en dirección de que el producto está libre de riesgos microbiológicos y por consiguiente es más seguro para consumo, esto no es del todo cierto. Las toxinas de ciertos microorganismos no se inactivan por calor y pueden estar presentes en forma activa en el en el producto cocido. Varias muestras fritas se encontraron crudas en su interior, aunque por fuera daban señales de estar cocidas. De ahí la importancia que tiene el que el producto crudo tenga poca carga microbiana. Las muestras de los kioscos 1 y 4 arrojaron densidades en orden de 10^3 después de fritas. Todas las demás muestras fueron menores de 10^2 hasta 0.

Pasadas dos horas o más de haber cocido la alcapurria la densidad microbiana se mantuvo en un mínimo, a excepción de las muestras en los kioscos 1,4 y 5. En los kioscos 4 y 5 se observa un aumento en densidad durante ese tiempo de cocido el producto. Este dato podría explicarse considerando la observación antes mencionada de que varias muestras de alcapurrias se encontraron crudas en su interior. Conforme el tiempo pasa, esas poblaciones aumentan su densidad, pues se encuentran a temperaturas moderadas o a temperatura de ambiente (Fernández, 1985). También podría explicarse como un evento de recolonización de organismos productores de esporas posterior a eliminarse la competencia con otros organismos. Una de las características más importantes en la carne de jueyes, es que si se procesa la misma adecuadamente es suficiente para inactivar las células vegetativas de las bacterias que son patógenas a los humanos. La presencia de bacterias patógenas en productos luego de ser procesadas es

causado por un proceso termal pobre, reintroducción de bacterias post-proceso o por sobrevivencia y desarrollo de bacterias formadoras de esporas (Buchanan, 1991).

Una observación común en todos los kioscos fue que el proceso de hacer las alcapurrias de jueyes era realizado sin guantes. Según Ingham y Moody (1990), el conteo de APC aumenta durante la extracción de la carne de jueyes cuando la misma se realiza de manera manual, a pesar que el animal se encuentra cocido. Por otro lado se observó que la mayoría de aquellas alcapurrias de jueyes que se prepararon en hojas de uva de playa (*Coccoloba uvifera*) o almendro (*Prunus amygdalus*) tuvieron un conteo microbiano más bajo que la que se manufacturaron en papel de aluminio o papel de cera (kioscos 1, 2, 3 y 7). Una posible respuesta a esta peculiaridad es que en los casos de papel de aluminio o de cera los recipientes de cartón corrugado donde se encontraban dichos materiales de envoltura contenían residuos de alimentos previos.

El manejo continuo de este tipo de material, sin tomar en consideración el lavado de manos adecuado, crea un ambiente idóneo para la contaminación cruzada. En el caso del contacto con hojas, se sabe que la materia vegetal es rica en compuestos que puedan afectar la presencia y supervivencia de organismos. Las sustancias inhibidoras son parte del arsenal bioquímico de las plantas (Raven, 1999). La inferencia se hace basada en los datos de conteo microbiano de las muestras crudas (Tabla 2).

El kiosco 4 (Guayanilla) fue el que presentó mayor densidad de bacterias heterotróficas, sobre 500,000 bacterias por gramo de producto. Este fue el único establecimiento donde el área de la cocina se encontraba en una posición no visible al público. No se pudo precisar las condiciones de almacenamiento y distribución de los

ingredientes en dicho kiosco, a pesar que el ambiente del mismo se encontraba limpio y ordenado.

Cabe señalar que en el momento en que se estaban recolectando las muestras, los empleados del establecimiento simultáneamente se encontraban extrayendo la carne de jueyes. Según estudios anteriores el punto más vulnerable en que se encuentra la carne de jueyes y sus derivados de contaminación con *Staphylococcus aureus* es en el momento de la separación del exoesqueleto y el músculo del animal (OH *et al*, 1992). Todo este proceso se realizaba sin tomar las medidas necesarias de protección como por ejemplo utilización de guantes. En este caso fui yo testigo de un perfecto ejemplo de contaminación cruzada.

Los resultados para detectar presencia de *Staphylococcus aureus* demostraron que independientemente del medio utilizado (MSA y BP) todas las muestras crudas dieron positivo a este organismo (Tablas 4 y 5). Los resultados estadísticos indicaron que tanto MSA y BP, pueden ser recomendados para la aislación de *Staphylococcus aureus*, ya que no existe diferencia significativa entre las densidades recuperadas usando ambos medios (Tabla 10).

El kiosco 4 (Guayanilla) mostró la densidad mayor de *Staphylococcus aureus* con contaje de sobre 800,000 bacteria por gramo de muestra. Las muestras que arrojaron resultados positivos, se confirmó la identidad de las colonias desarrolladas en los medios de MSA y BP mediante las pruebas de term nucleasa, aglutinación y manitol (Tabla 11). Como resultado de estas pruebas de confirmación sólo los kioscos 1, 4, 7, 8, 9 y 10 dieron positivos a *Staphylococcus aureus* (cepa patogénica). Este proceso de

recuperación de *Staphylococcus aureus* y las pruebas subsiguientes son las descritas en los métodos tradicionales (BAM).

Sin embargo al utilizar métodos automatizados (VITEK y BIOLOG) para las muestras positivas de esta bacteria, los resultados fueron diferentes (Tabla 12). Esto presenta una situación de cuidado al momento de utilizar estos métodos. Existen una serie de factores que podrían afectar la identificación mediante estas tecnologías. La identificación solo se lleva a cabo a discreción de la matriz insertada por el fabricante. Además la persona que maneje el instrumento requiere adiestramiento y las muestras deben estar en etapa de crecimiento apropiado para las pruebas. Estos factores añaden la posibilidad de que un falso positivo pueda ser identificado erróneamente y/o un positivo no se identifique. Según sistema automatizado solo las muestras de los kioscos 1, 4 y 10 dieron positivos a un *Staphylococcus spp.* Las muestras de los kioscos 4, 7, 8, 9 y 10, mediante métodos tradicionales (i.e. medios de cultivo en medios selectivos) mostraron la presencia de la bacteria en la variante cruda y la muestra del kiosco 1 en la variante cocida 1.

Según indican las Tablas 4 y 5, una vez se someten a calor (cocida 1) las densidades se reducen considerablemente. En los datos de las Tablas 8 y 9 se pueden confirmar la diferencia en densidad entre las tres etapas de procesamiento ya mencionadas. Las muestras crudas mostraron las densidades más altas de *Staphylococcus aureus*. Entre las variables cocida 1 y cocida 2 no se detectaron grandes diferencias. Ciertamente los tratamientos de calor tienen un efecto mayormente bactericida y sin dudas la reducción en densidades es esperada. Un factor importante a considerar en este caso es que las cepas patogénicas de *Staphylococcus aureus* producen una enterotoxina resistente a calor.

Los resultados evidenciaron presencia de esta bacteria en una muestra cocida (kiosco 1) que seguramente no sería sometida de nuevo a temperaturas altas y que posiblemente tuvo una contaminación post-proceso.

En las muestras de los kioscos 4 y 5 se observó una disminución en densidad luego de fritas y posteriormente un aumento conforme transcurrió el tiempo de dos horas (cocida 2). Este resultado podría ser a causa de factores tales como muestras que no estuviesen bien cocidas inicialmente (semi-crudas) y/o contaminación post-proceso.

Staphylococcus aureus es un indicador de contaminación en alimentos que conllevan particularmente gran manipulación y es altamente vulnerable a tratamientos por calor y a agentes sanitizantes. La presencia de esta bacteria o sus enterotoxinas en alimentos procesados o en equipo de procesamiento es generalmente un indicador de pobre sanitización. El peligro con *Staphylococcus aureus* puede ser controlado mediante la reducción del abuso de tiempo y temperatura especialmente luego de la cocción de los alimentos. En adición requerir al personal que está en contacto directo con dichos productos una higiene adecuada (Ward et al., 1997).

Cabe señalar que las muestras crudas de los kioscos 4 y 5 se encontraban congeladas al momento del muestreo. Se podría haber deducido que la densidad de *Staphylococcus aureus* hubiera sido más baja, pero no fue así. *Staphylococcus aureus* es un patógeno que sobrevive muy bien durante almacenamiento a temperaturas de congelación (Fernández y de Caloni, 1983). Estudios realizados por Foster *et al*, 1977, Licciardello y Hill, 1978 y Surkiewicz *et al*, 1979, sugieren que se ha podido aislar *Staphylococcus aureus* en productos refrigerados y congelados.

En comunicación escrita de la Sra. Yaniré García Guadalupe, MPH, Bioestadística de la división de Epidemiología Estatal en Puerto Rico, se indica que existe evidencia de casos reportados con envenenamiento estafilococal o intoxicación alimentaria, pero al momento de escribir este trabajo la misma no se encontraba disponible de forma computadorizada, lo cual se hace difícil la divulgación de dicha información (Apéndice 2).

La presencia de *Listeria monocytogenes* en las muestras estudiadas fue confirmada utilizando tres medios de cultivo (Oxford, Palcam y McBride). El análisis estadístico de tablas de contingencia comparando los perfiles de recuperación bacteriana en estos medios reflejó que una diferencia significativa por medio de cultivo (Tabla 18), siendo el más efectivo en recuperación el medio Oxford. Se detectó presencia de *Listeria monocytogenes* en todas las muestras crudas a excepción de las muestras de los kioscos 10 y 13 (Tabla 13). La presencia mayor se observó en los kioscos 5 y 6. Un dato observado por esta servidora fue que esos kioscos fueron los únicos donde la variante cruda se encontraba congelada. Además de las variables cruda se volvió a detectar *Listeria monocytogenes* en las muestras de la variable cocida 2 de los kioscos 4, 5 y 6.

Listeria monocytogenes es una bacteria que sobrevive a temperaturas bajas y es ubicuota a nivel ambiental lo que confirma los resultados obtenidos por este estudio. Las muestras que llevaban dos horas o más de cocidas (cocida 2) pudieron haber estado semi-crudas y quizás por tal razón *Listeria monocytogenes* se recuperó bajo esas condiciones. Mediante las pruebas de SIM y catalasa se confirmaron como positivas las muestras de los kioscos 1, 5, 8 y 11 (Tabla 19). Al comparar los métodos tradicionales versus los automatizados (VITEK y BIOLOG) para detectar a *Listeria monocytogenes*, se repite la

situación presentada en el caso del patógeno anterior donde los sistemas automatizados no detectaron la presencia del patógeno (Tabla 20). En las Tablas 16 y 17 se observaron los análisis que confirman estadísticamente diferencias en el tratamiento dado a las muestras y la presencia de la bacteria. Indiscutiblemente el calor reduce sustancialmente al patógeno y su presencia posteriormente responde a contaminación post-proceso. Según Ray *et al*, 1976, la carne de jueyes producida bajo buenas condiciones sanitarias tiende a presentar conteos bajos de aerobios totales y psicrotrófico. La contaminación post-proceso se produce regularmente por mecanismos de pobre cocción o temperaturas inadecuadas.

Listeria monocytogenes es una bacteria que causa daño con una presencia mínima a un grupo de la población que se encuentra susceptible (inmunocomprometidos, mujeres embarazadas, niños, envejecientes), lo cual puede tener consecuencias fatales.

Según la información ofrecida en comunicación personal la Sra. Yaniré García Guadalupe, MPH, Bioestadística de la división de Epidemiología Estatal en Puerto Rico en los últimos cuatro años se han reportado solo 2 casos de listeriosis, estos pertenecientes al año 2002 (Apéndice 2A).

Los resultados obtenidos en esta investigación no detectaron presencia de *Escherichia coli* en ninguna de las muestras de alcapurrias de jueyes mediante la prueba NMP (Tabla 21). Sí se detectó presencia de otras *Enterobacteriaceae* como *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella planticola* (Tabla 22), todas ellas en muestras crudas de los kioscos 4, 5, 6, 12 y 13. Al menos los datos obtenidos nos ofrecen información de un manejo higiénico por parte de la mayoría del personal de los kioscos estudiados. Es posible que en términos competitivos las variables patogénicas de *Escherichia coli* no

sobrevivieran en el microambiente provisto por las alcapurrias. Esta bacteria se elimina con calor fácilmente y el resto de las enterobacterias también (Tabla 21). No se puede descartar la posibilidad de que en un momento donde no se sigan controles estrictos de higiene esta bacteria se presente en este tipo de producto.

Según muestra la Tabla 23 los métodos de identificación automatizados no detectaron presencia de *Enterobacteriaceae* o de *Escherichia coli*.

De todas las muestras estudiadas fueron las del kiosco 4 (Guayanilla) las que consistentemente mostraron mayor densidad microbiana y presencia de patógenos. En general este establecimiento tiene una estructura construida en concreto, madera y zinc. El área de la cocina se encontraba separada del lugar donde se atendía al público. Todo lucía bien limpio. Las condiciones de almacenamiento de los ingredientes eran desconocidas debido a que no se pudo observar el área de preparación y cocción. Las alcapurrias de ese lugar consistían de una masa de yuca y la envoltura era de papel de aluminio. Este lugar fue muestreado en periodo de verano 2003 y el factor de temperatura alta se podría considerar como una variable de importancia en ese sitio. Es imprescindible que los lugares de preparación de comida adiestren a su personal y mantengan buenos controles de limpieza e higiene durante la confección de sus productos.

Las muestras obtenidas en los kioscos del norte del país (Luquillo y Loíza) fueron los que mostraron los contajes más bajos en densidad microbiana y presencia de los patógenos. El kiosco 1 (Luquillo), está construido en concreto. El área de la cocina se encuentra separada del lugar donde se atendía al público. Todo lucía bien limpio. Cada ingrediente, incluyendo el relleno de las frituras se encontraba en la nevera en envases

identificados. Las alcapurrias se frieron en aceite vegetal en un sartén, (gas fluido) el producto no se encontraba cubierto en su totalidad por el aceite. La masa de las alcapurrias estaba hecha con yuca y yautía. La envoltura de las mismas se realizó en hoja de almendro.

Los kioscos 2 y 3 (Loíza) son establecimientos que tienen una construcción en madera y zinc. El área de la cocina se encontraba al aire libre, frente donde se atiende el público. Estos lugares se encuentran a menos de 50 pies de la vía de rodaje principal. Tanto el relleno como la masa de las alcapurrias se encontraban fuera de refrigeración. Las alcapurrias se frieron en calderos (carbón) donde las alcapurrias quedaban completamente sumergidas. La masa de las alcapurrias estaba hecha con yuca y yautía (kiosco 2) y yautía solamente (kiosco 3). La envoltura de las mismas se realizó en hoja de uva de playa.

Conclusión

Los hallazgos encontrados en este estudio demuestran una diferencia significativa en la carga microbiana inicial presente en diversas muestras crudas de este alimento indicando unas formas o métodos de manufactura más apropiados en algunos establecimientos que en otros. Es necesario determinar las prácticas de dichos establecimientos para delinear un método de manufactura en común y así reducir el riesgo de consumir un producto no inocuo.

La cantidad de microorganismos encontrados en las muestras pudo haber estado influenciado por las prácticas inadecuadas de higiene, abuso de temperatura y procesos de cocción a las que fueron sometidas algunas muestras previo a su recolección. Los resultados de los productos cocidos y mantenidos tibios demuestran que los tratamientos de calor eliminan la mayoría de los organismos, y en muchos casos, controlan prácticamente a todos los patógenos presentes. Esto no reduce la probabilidad de presencia de toxinas necesariamente en los casos donde se volvió a recuperar *Staphylococcus aureus* post-proceso de calor. Siempre y cuando no haya contaminación luego de freír, el mantener estos alimentos cocidos y tibios no afecta adversamente su calidad microbiológica (Fernández, 1985).

Los métodos de identificación tradicionales basados en cultivo en medios selectivos proveen una herramienta de fácil ejecución y de bajo costo que permite monitorear la calidad de los alimentos que reciben una manipulación intensa. Aún cuando hoy día se cuenta con métodos automatizados que permiten una identificación más específica, se continúa dependiendo del cultivo tradicional para poderlos utilizar.

Según se programen esos sistemas automatizados será la identificación que se realice y esto puede estar sujeto a múltiples variables. Los costos y manejo de estos equipos le restan a la posibilidad de uso rutinario para analizar muestras de alimentos.

En cuanto a la seguridad de alimentos es preferible un falso positivo, que asegure un proceso o medidas de control más estrictas, a un falso negativo que pueda representar pasar por alto la presencia o riesgo de un patógeno alimentario. Los métodos automatizados deben utilizarse para complementar el proceso de aislamiento e identificación y no como sustitución.

Plan general HACCP para Alcapurrias de Jueyes

Las siglas HACCP “Hazard Analysis Control Critical Point” se traducen como Análisis de Peligro de Puntos Críticos de Control. Este es un sistema diseñado para poder identificar, evaluar y controlar peligros biológicos, químicos y físicos en los alimentos y a través del procesamiento de los mismos. Se basa en siete principios cuya meta principal es prevenir enfermedades que puedan ser transmitidas a través de la ingesta de alimentos. El establecimiento de este plan es un esfuerzo conjunto en el 1985 entre las siguientes agencias FSIS (Food Safety Inspection Service), FDA (Food and Drug Administration), USDA (United States Department Agriculture), NOAA (National Oceanic Atmospheric Administration), USDD (United States Department of Defense), Departamento de Industriales y Académicos.

En el 1992 se concreta y presenta el sistema HACCP, un sistema preventivo de inocuidad en los alimentos. En el cual el proceso de producción, elaboración, distribución, almacenamiento y consumo son cuidadosamente analizados. Este se utiliza para controlar aquellos pasos en los que se pueda eliminar los peligros potenciales identificados y se establezcan medidas preventivas correctivas (Latorre *et al.*, 2002).

En el caso de HACCP para productos marinos no es hasta el 18 de diciembre de 1998 que entra efectivo este plan. Esto a causa de un caso en el 1995 cuando el CDC (Centers of Disease Control) reportó una incidencia de 34 casos de envenenamiento con síntomas similares al del virus de Norwalk por la ingesta de ostras cultivadas en el área sureste de los Estados Unidos. Pero el caso que determinó y aceleró el proceso de la creación de un plan HACCP para productos provenientes del mar fue la intoxicación de

26 empleados del World Bank en Washington, D.C., que al ingerir pez espada en la cafetería de dicho lugar desarrollaron envenenamiento escombroides. Esta es la primera vez que el sistema HACCP es requerido para lugares donde se procesa y se almacena alimentos que se utilizarán como materia base o prima en las industrias en los Estados Unidos. Este sistema está enfocado para identificar y controlar peligros o riesgos que puedan causar enfermedades alimentarias a través del desarrollo de puntos de control y monitoreo en los procesos de manufactura y muestreos al azar de los productos marinos para asegurar la inocuidad de dichos productos (Kurtzweil, 1997).

Los mariscos son expuestos a una serie de peligros desde que se encuentran en su medio ambiente natural hasta que llegan a la mesa. Los peligros que se pueden encontrar presentes son bacterias, virus, parásitos, toxinas naturales y contaminantes químicos (Kurtzweil, 1997).

El sistema HACCP que las compañías necesitan seguir para evitar peligros en los sus productos marinos se condensa en siete pasos:

1. Analizar los riesgos. Cada procesador tiene que determinar el potencial de riesgo asociado con cada producto marino y las medidas que necesita para controlar ese riesgo o peligro. El peligro puede ser biológico, como un microorganismo; químico como mercurio o una toxina; o físico como lo es residuos de vidrio.
2. Identificar puntos críticos de control, como lo son el proceso de cocción o enfriamiento, donde el peligro potencial se puede controlar o eliminar. Esto según el diseño de un árbol de decisiones para identificar puntos críticos de control.
3. Establecer medidas preventivas con límites críticos para cada punto de control.

4. Establecer procedimientos de monitoreo para cada punto crítico de control. Este punto incluye determinar cual es el tiempo de cocción y como se van a monitorear las temperaturas y por quién.
5. Establecer las acciones correctivas que se llevaran a cabo en caso de que el punto crítico no cumpla con los requisitos de monitoreo. En adición que acciones se van a incluir en el reprocesamiento de los mariscos ó en la disposición del mismo según sea el caso.
6. Establecer procedimientos para verificar que el sistema operativo esta trabajando correctamente.
7. Establecer mantenimiento adecuado de documentación.

El establecimiento de este plan ayudará a evitar la contaminación cruzada de un alimento crudo y/o fresco a un alimento procesado listo para consumo y/o que no requiere cocción. También ayudará a evitar el abuso de temperatura que permita el crecimiento de bacterias y producción de toxinas y por último evitar la contaminación física y química. Cada estipendio de comida deberá desarrollar, implementar y mantener dicho plan (Latorre *et al.*, 2002).

Como compromiso con la sociedad en este trabajo de investigación se presenta un plan HACCP diseñado para las alcapurrias de jueyes. En este plan se discute por completo el proceso de manufactura de dicho producto y se identifican los puntos críticos de control del mismo. Se espera que el mismo sea de gran ayuda para un posible comienzo de implementaciones de dicho plan a nuestras comidas típicas y el nacimiento de una sociedad receptiva y consciente de la inocuidad en los alimentos.

Paso 1: Información general

- Compañía: Kioscos Puertorriqueños
- Localización: Distribuidos alrededor de toda la isla de Puerto Rico
- Producto: Alcapurrias de Jueyes
- Código del Producto: 2004-AJ-10035
- Información Adicional: Este producto esta catalogado como listo para cocinar y/o listo para comer
- **Equipo HACCP**

Este equipo estará compuesto por aquellas personas que están directamente relacionados con el funcionamiento del kiosco:

- 1) Personal a cargo del manejo y confección de alimentos.
- 2) Personal a cargo de la compra y almacenamiento de víveres.
- 3) Personal a cargo de venta y distribución de las alcapurrias de jueyes.
- 4) Personal administrativo
- 5) Se recomienda presencia de algún personal relacionado al Departamento de Salud ó alguna agencia relacionada con visitas e inspección a dichos establecimientos de forma regular.

Nota: Se debe observar que la mayoría ó inclusive en muchos casos todas las responsabilidades descritas anteriormente, excepto # 5, recaen sobre 1 ó 2 personas solamente, en su mayoría en los dueños de dichos establecimientos. Para poder cumplir los puntos anteriores debe de realizarse un entrenamiento intensivo sobre dichos puntos y las responsabilidades que conlleva los mismos.

Paso 2: Descripción del Producto e Identificación del Consumidor

- Nombre común: Alcapurrias de Jueyes
- ¿Cómo se va a usar?: Listo para cocinar y/o listo para comer
- Tipo de empaque: Para el producto listo para cocinar, como envoltura primaria se vislumbra que cada alcapurria de jueyes esté envuelta en papel de cera, luego se empacan en bandejas de polietileno (empaque secundario) envuelto en papel plástico. Para el producto listo para comer que se encuentra expuesto en las vidrieras de los establecimientos, se recomienda que las alcapurrias se encuentren dentro de envases plásticos o desechables exclusivos para su uso. Las alcapurrias de jueyes deben ser extraídas de las vidrieras con pinzas de metal predestinadas para el uso exclusivo de dicho producto. Se refiere a este punto no utilizar las mismas pinzas de metal que se utilizan para servir el pescado frito, rellenos de papa etc.
- Tiempo de vida útil ¿A qué temperatura?: Para el producto listo para cocinar, se recomienda que el mismo se mantenga congelado a una temperatura de 0°F, el largo de vida del producto en esta temperatura sobrepasa los tres meses, no se recomienda más de este periodo porque puede verse afectado las características

organolépticas del producto específicamente el sabor. En el producto listo para comer el mismo debe freírse a 177°C (350°F) se recomienda que sea colocado en una vidriera cerrada con acceso controlado adaptada con luz incandescente que mantenga una temperatura 57°C (135°F) en el interior de la misma. Se recomienda que el producto no esté más de 4 horas expuesto para la venta, si esto ocurriese debe de descartarse el producto.

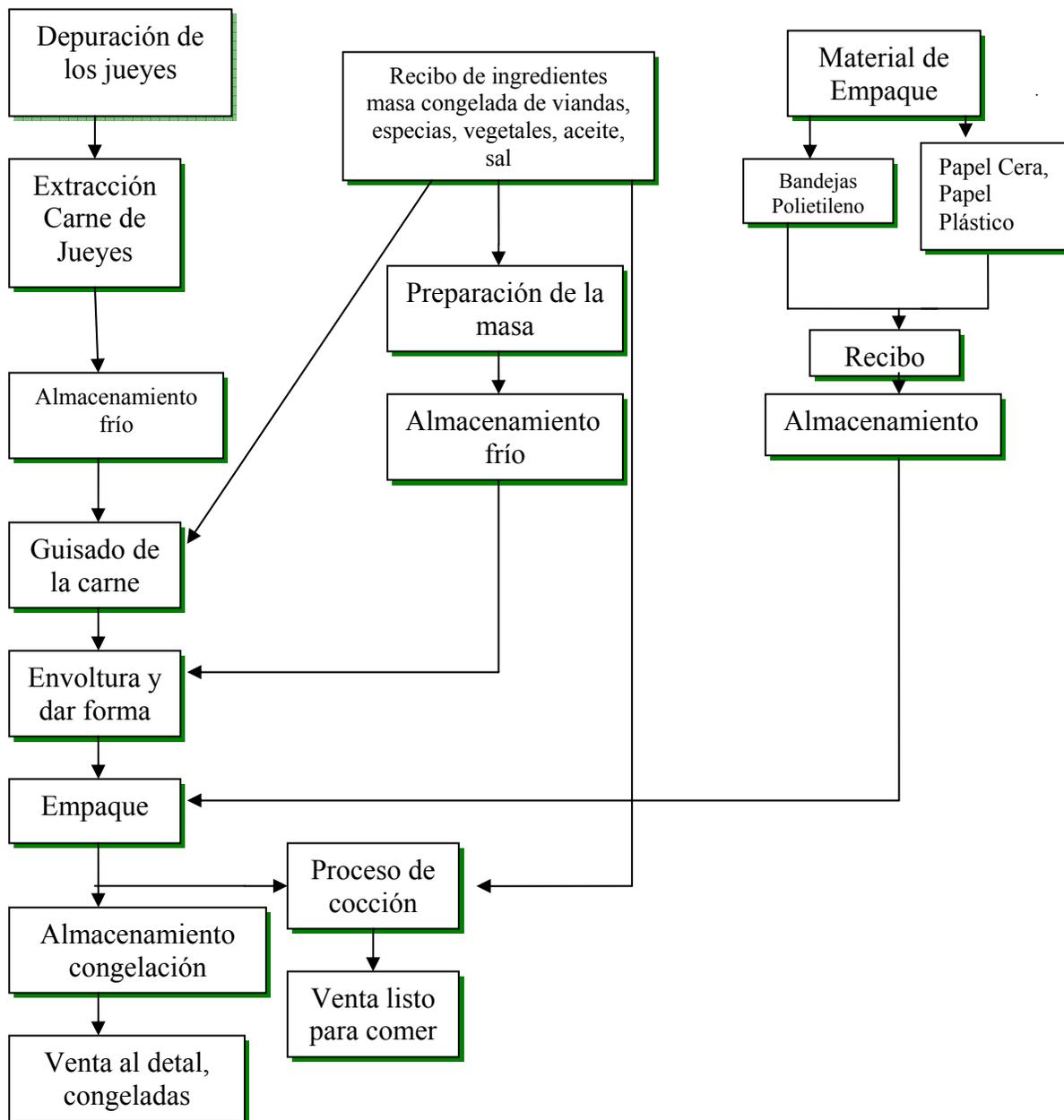
- Instrucciones en la etiqueta: Para el producto listo para cocinar leería mantener congelado hasta el momento de utilizar. Cocinar antes de consumir. Para el producto listo para comer deben escribirse en un lugar accesible antes de despachar las alcapurrias de jueyes las instrucciones de manejo de las mismas descritas anteriormente.
- ¿Es necesario un control de distribución especial?: En el caso del producto listo para cocinar debe mantenerse en un congelador a una temperatura monitoreada constantemente de 0°F hasta el momento de ser adquirida por el consumidor. En el caso del producto listo para comer, es muy importante la temperatura dentro de la vidriera sea 57°C (135°F) y otro factor importante sería el tiempo de distribución.

Paso 3: Productos e Ingredientes

- Masa congelada de Viandas
- Carne de Jueyes
- Pimientos Verdes
- Pimientos Morrones
- Cebolla
- Ajo
- Salsa de Tomate
- Aceite
- Achiote
- Sal

Paso 4: Diagrama de Flujo del Producto o Proceso

Producto: Alcapurrias de Jueyes



Análisis de Peligro de Puntos Críticos de Control (HACCP)

Forma 1

Ingredientes o Etapas de Proceso	Peligro Potencial ¹ Introducido, controlados o intensificados en esta etapa	Este peligro potencial ¿Requiere ser abordado en el plan HACCP? (sí o no)	¿Por qué? Justificación por la decisión hecha en la etapa anterior ²	¿Qué medidas se pueden aplicar para: prevenir, eliminar o reducir el peligro que está siendo abordado en su plan HACCP? ³	¿Es esta etapa un punto crítico de control PCC? ⁴
Depuración del juey	B: Patógenos Q: No hay F: No hay	No	El producto no está listo para ser consumido. Se espera que el producto sea cocido en su totalidad antes de ser consumido.		
Extracción de la carne de juey	B: Patógenos Q: Toxinas mariscos F: Particulado exoesqueleto	Sí Sí No	La pérdida de control de tiempo, temperatura y manipulación directa constante mientras se extrae la carne promueve el crecimiento de bacterias patógenas. Desarrollo de alergias aquellas personas susceptibles a toxinas de mariscos y Presencia de particulado del exoesqueleto del animal es poco probable de que dé como resultado un producto cuyo consumo no sea seguro.	Mientras se procede con la extracción de la carne, el recipiente donde se coloca la misma debe de estar en un baño de hielo. Alertar acerca del alergeno.	Sí PCC1(B) PCC1(Q)
Almacenamiento Refrigerado	B: Patógenos Q: No hay F: No hay	Sí No No	Existe potencial de que la temperatura en el refrigerador no sea adecuada para reducir y/o controlar el crecimiento de patógenos.	Para reducir el crecimiento de bacterias patógenas, es necesario mantener una temperatura de refrigeración de 4°C o menos.	Sí PCC2(B)
Guisado de la carne	B: Patógenos Q: No hay F: No	No No No	El lapso de tiempo y temperatura de cocción a la cual es sometida la carne es suficiente como para reducir el potencial de patógenos presentes.		

Envoltura y dar forma	B: Patógenos Q: No hay F: No hay	Sí No No	La manipulación manual excesiva en este paso promueve el crecimiento de bacterias patógenas (i.e. <i>Staphylococcus aureus</i>). Adición la pérdida de tiempo y temperatura promueve la multiplicación de microorganismos patógenos.	Se recomienda que la masa y la carne se mantengan a una temperatura de refrigeración (4°C) y el uso continuo de guantes desechables mientras se maneja la masa.	Sí PCC3(B)
Empaque	B: No hay Q: No hay F: No hay	No No No			
Almacenamiento- Congelación	B: Patógenos Q: No hay F: No hay	No No No	El producto se almacena y se distribuye congelado, por lo que es bien poco probable la proliferación de patógenos.		
Proceso de cocción (fritas)	B: Patógenos Q: Aceite rancio F: No hay	Sí No No	Es probable que sí existan patógenos si el proceso de cocción no es el adecuado.		Sí PCC4(B)
Venta listo para comer	B: Patógenos Q: No hay F: No hay	Sí No No	Al pasar en tiempo y el producto perder su temperatura luego de frito, puede convertirse en un producto peligroso. Esto siempre y cuando existiera la posibilidad de producción de enterotoxinas previo al proceso de cocción.	Disponer del producto a las 4 horas después de cocido el producto.	Sí PCC5(B)

Notas:

¹ Peligro se clasifica como biológico, químico o físico

² Cite las justificaciones hechas para tomar su decisión basado en la severidad y ocurrencia del peligro

³ Cite las medidas de control en su operación que ocurren en este paso u otro posterior

⁴ Use el árbol de decisiones para ayudarlo a identificar el PCC (apéndice 3).

Formulario Plan HACCP

Paso en el Proceso, Punto Crítico de Control	Peligro(s) que serán abordados en plan HACCP	Límite Críticos para cada medida de control	Monitoreo				Acción Correctiva
			¿Qué?	¿Cómo?	Frecuencia	¿Quién?	
PCC1(B) (Extracción carne de jueyes) PCC2(B) (Almacenamiento refrigerado) PCC3(B) (Envoltura y dar forma) PCC4(B) (Método de cocción) PCC5(B) (Venta listo para comer)	Formación de enterotoxina de <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ¹ Desarrollo de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> ²	< 41°F (5°C) < 41°F (5°C), no más de 7 días < 41°F (5°C) no más de 4 horas 165°F / 15seg Temp. aprox. mínima de 135°F (57°C)	Temperatura debe ser monitoreada constantemente	Chequeo manual de la temperatura en el envase de la carne extraída, de la masa preparada y de las vitrinas con luz incandescente con un termómetro calibrado. Verificar temperatura interna del alimento.	Cada vez que se comience con la extracción de la carne hasta que se concluya con el proceso	Persona encargada de la confección de los alimentos	Si la temperatura ha excedido el límite de 10°C por mas de 4 horas (§3-501.19), se descarta el producto (§ 3-701.11) Descartar el contenido de los envases, limpiar y sanitizar los mismos. Realizar reparaciones al refrigerador. Realizar monitoreo de temperatura a las vitrinas con luz incandescente, cambiar bombillas y verificar que todos los sellos del gabinete se encuentren en óptimas condiciones.

PCCI(Q) (Extracción carne de jueyes)	Presencia de toxinas marinas ³	Evitar cualquier contacto con otros productos que se manufacturen que no procedan del mar.	Alérgenos	Verificar que no existan residuos de la carne de jueyes en las superficies donde se manufacturan los productos que no sean destinados al área de mariscos.	En todo momento en que se esté trabajando o realizando esta acción	Persona encargada de la confección de los alimentos	Asignar un área destinada para la extracción de carne de mariscos.
---	---	--	-----------	--	--	---	--

Notas:

¹ de Caloni y Fernandez, 1983; Lancette y Bennett, 2001; OH *et al*, 1992

² Buchanan, 1991; Poysky *et al*, 1993; Stanley, 200

³ Taylor y Helfe, 2005

Formulario Plan HACCP

continuación

Paso en el Proceso, Punto Crítico de Control	Actividades de Verificación	Procedimientos de Mantenimiento de Registros
PCC1(B) (Extracción carne de jueyes) PCC2(B) (Almacenamiento refrigerado) PCC3(B) (Envoltura y dar forma) PCC 4(B) (Método de cocción) PCC5(B) (Venta listo para comer)	Asegurar que el personal encargado de la calidad inspeccione los envases (PCC1), las neveras (PCC2) y las vitrinas (PCC4) cada 2 horas. Los empleados que estén llevando a cabo la envoltura y dar la forma al producto (PCC3) deben llevar puestos guantes desechables (§ 3-304.15)	Registro de inspección del monitoreo de las temperaturas tanto de los termómetros manuales (PCC1) como los termómetros en el interior de las neveras (PCC2) y vitrinas (PCC3). Registro de las acciones correctivas Registro de verificaciones del encargado de calidad.
PCC1(Q) (Extracción carne de jueyes)	Asegurar que el personal de calidad inspeccione el área antes y después de la extracción de la carne. Verificar que todo esté limpio y sanitizado. Verificar que no hayan quedado residuos de exoesqueleto, ni carne del animal en las superficies y notar si existe algún particulado antes mencionado fuera del área designada.	Registro de inspección del área designada. Registro de limpieza del área designada Registro de sanitización del área designada.

Recomendaciones

- Concientizar a la comunidad de una forma más activa en relación a las condiciones de inocuidad en alimentos vendidos de forma típica (popular), a través de seminarios y programas especiales de prevención de enfermedades alimentarias.
- Tratar de poner en práctica un plan HACCP (Análisis de Puntos Críticos de Control) para este tipo de comida rápida puertorriqueña.
- Promover entre la población dueña de este tipo de establecimiento, una guía estándar que incluya todos los pasos relacionados desde higiene personal laboral hasta limpieza y sanitización del establecimiento.
- El Departamento de Salud de Puerto Rico debe ser más agresivo en su gestión de recolección de data concerniente a este tipo de establecimiento, para así tener una perspectiva real de cómo se afecta la salud del puertorriqueño en relación con este tema.
- Utilizar sondas genéticas para identificaciones más precisas en productos alimentarios a analizar.
- Realizar un estudio para determinar el largo de vida útil de las alcapurrias de jueyes y poder observar con mayor detenimiento el efecto de tiempo y abuso de temperatura tomando como ejemplo las tres variantes experimentales presentadas en este trabajo.
- Se debe realizar un estudio de inoculación con concentraciones conocidas de dichos microorganismos para monitorear los cambios en densidades y sus efectos a lo largo del procesamiento del alimento y cómo se afectan las características organolépticas del producto.
- Se debe crear un banco de datos sobre calidad microbiológica de los productos típicos de nuestro país, pues al momento no existe esta referencia.

Referencias

- Asperger, H., H. Heisteringer, M. Wagner, A. Lehner, and E. Brandl. 1999. A contribution of *Listeria* enrichment methodology growth of *Listeria monocytogenes* under varying conditions concerning enrichment broth composition, cheese matrices and competing microbial flora. *Food Microbiol.* 16: 419-431.
- Bacteriological Analytical Manual. 1998. U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, 8th Edition, Revision A.
- Beumer, R. R., Giffel, M.C.T., Kok, M.C.Y., Rombouts. 1996. Confirmation and identification of *Listeria spp.* *Lett. Appl. Microbiol.* 22: 448-452.
- Brower, J.E., Zar, J.H., von Ende, C.N. 1997. *Field and Laboratory Methods for General Ecology.* 4th ed. WCB McGraw-Hill publisher. : 7- 21, 152-159
- Buchanan, R.L. 1991. Microbiological criteria for cooked ready to eat shrimp and crabmeat. *Food Technol.* 4: 157-160.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, I., Cantoni, C. and Comi, G. 2002. Direct identification in food samples of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(12): 6273-6282.
- Cormier, A., Chiasson, S., and Malovin, H. 1993. Survival of *Listeria monocytogenes* in lobster meat during selected heat treatment conditions. *Sea Grant. Tropical and Subtropical Fisheries Technological Conference of the Americas.* Food Research Centre. 127-135.
- de Caloni, I.B. and Cruz-Cay, J. 1984. Elaboration and evaluation of typical Puerto Rican dishes prepared with mixture of plantain, cassava and tannier flour. *J. Agri. Univ. P.R.* 68(1): 67-74.
- de Caloni, I.B. and Fernández-Coll, F. 1983. Elaboration, sensory and microbiological evaluation of mofongo. *J. Agri. Univ. P.R.* 67(2): 95-99.
- Degnan, A.J., Kaspar, C.W., Murphee, R.L., Otwell, S., Tamplin, M.L., and Luchansky, J.B. 1993. Control of *Listeria monocytogenes* in blue crab meat using lactic acid bacteria fermentates. *Proceeding of the 18th Annual Tropical and Subtropical Fisheries Conference* : 173-179.
- Diaz-De Villegas, J.L. 2004. Puerto Rico, La Gran Cocina del Caribe. Editorial de la Universidad de Puerto Rico. San Juan, Puerto Rico. Fotos: 132 y 253.

- Farber, J.M., Daley, E.M., Mackie, M.T. and Limerick, B. II. 2000. A small outbreak of listeriosis potentially linked to the consumption of imitation crab meat. *Microbiol.* 31(2): 100-104.
- Fernández-Coll, F. 1985. Microbiological quality of some Puerto Rican fast foods.I Processor level; frozen or refrigerated. *J. Agri. Univ. P.R.* 69(1): 81-89.
- Fernández-Coll, F. 1985. Microbiological quality of some Puerto Rican fast foods.II Processor level; frozen or fried. *J. Agri. Univ. P.R.* 69(1): 91-97.
- Flanders, K.J. and C.W. Donnelly. 1994. Injury, resuscitation and detection of *Listeria spp.* from frozen environments. *Food Microbiol.* 11: 473-480.
- Frazier, W.C., and Westhoff, D.C., 1988. Food-borne illness: Bacterial. *Food Microbiology.* 4th ed. Mc Graw Hill Publ. New York.: 56-57;401-404.
- Food Code, 1999. Nature and Extent of foodborne illness. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Food and Drug Administration. Washington, DC.
- Foster, J.F., Fowler, J.L. and Dacey, J., 1977. A microbial survey of various fresh and frozen seafood products. *J. Food Prot.* 40: 300-303.
- García, Y. and Alvarado Ramy, F. 2003. Enfermedades de notificación obligatoria en Puerto Rico: Deber ministerial de los profesionales de la salud. *Boletín Epidemiológico.* 19(2): 1-5.
- Goh, K.T. 2002. An outbreak of food poisoning traced to consumption of fried fish cakes. *Epidemiological News Bulletin.* 28(3): 15-17.
- Heisick, J.E., Rosas-Marty, L.I. and Tatini, S.R. 1995. Enumeration of viable *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* in foods. *J. Food Prot.* 58: 733-736.
- Hitchins, A.D., and Duval R.E. 2000. Feasibility of a defined microflora challenge method for evaluating the efficacy of foodborne *Listeria monocytogenes* selective enrichments. *J. Food Prot.* 63: 1064-1070.
- Ingham, S.C., and Moodly, M.N. 1990. Enumeration of aerobic plate count and *Escherichia coli* during blue crab processing by standard methods, petrifilm and redigel. *J. Food Prot.* 53(5): 423-424.
- Jensen, M.M., Wright, D.N., Robinson, R.A. 1997. Microorganisms in foods. The scope of Microbiology. *Microbiology for the health sciences.* 4th ed. Prentice Hall Publ. New Jersey: 22-23; 201-202; 291,302-303.

- Kurtzweil, P. 1997. Critical steps toward safer seafood. U.S. Food and Drug Administration. FDA Consumer. November-December 1997; Revised February 1998 and February 1999: 1-7.
<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fsafe3.html>
- Lammerding, A.M., Fazil, A.M., and Paoli, G.M. 2001. Microbial food safety risk assessment. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. APHA Publ. Washington, D.C.: 267-282.
- Lancette, G.A., and Bennett, R.W. 2001. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. APHA Publ. Washington, D.C.: 387-403.
- Latorre, J.R., Negrón, E.T. and Plaza, M.L. 2002. Seminario: Desde la finca...a la mesa; Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Ciencia y Tecnología de Alimentos. Programa de Educación Continua.
- Licciardello, J.J. and Hill, W.S., 1978. Microbiological quality of commercial frozen minced fish blocks. J. Food Prot. 41: 948-952.
- Licciardello, J.J. and Hill, W.S. 1978. Microbiological quality of commercial frozen beef, poultry and tuna pies. J. Milk Food Technol. 20: 216-219.
- Lovett, J., and Twedt, R. 1988. *Listeria*. Outstanding symposia in food science and technology. Food Technol. 8(4): 188-191.
- Mazzotta, A.S. 2001. Thermal inactivation of stationary-phase and salt-adapted *Listeria monocytogenes* during post process pasteurization of surimi-based imitation crab meat. J. Food Prot. 64: 483-485.
- McLauchlin, J. 1997. The identification of *Listeria spp.* Int. J. Food. Microbiol. 38: 77-81.
- Nickelson, R. and Finne, G. 1992. Fish, crustaceans, and precooked seafoods. Ch. 47. In Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed., C. Vanderzant and D. F. Splittstoesser (Ed.), p. 875-895. American Public Health Association, Washington, DC.
- Nickelson, R.II, Mc Carthy, S., and Finne, G. 2001. Fish, crustaceans and pre-cooked seafoods. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. APHA Publ. Washington, D.C.: 497-505.

- OH, D., Marshall, D.L., Moody, M.N., and Bankston, J.D. 1992. Comparison of forced-air cooling with static-air cooling on the microbiological quality of cooked blue crabs. *J. Food Prot.* 55: 104-107.
- Orden Administrativa Núm 177, 2004. Estado Libre Asociado de Puerto Rico, Departamento de Salud. Para emitir el listado de enfermedades y condiciones de salud notificables al Departamento de Salud a partir del 1ro de marzo de 2004 de conformidad con las leyes vigentes en virtud de la autoridad que le confiere la Ley Número 81 del 14 de marzo de 1912, según enmendada.
- Power, D.A. and McCuen, P.J. 1988. Manual of BBL[®] Products and Laboratory Procedures 6th Ed. Becton Dickinson Microbiology Systems. Maryland, USA. Cat No. 52000: 109, 193,195
- Poysky, F.T., Paranjpye, R.N., Lashbrook, L.C., Peterson, M.E., Pelroy, G.A., and Eklund, M.W. 1993. Selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* from foods. *J. Food Prot.* 56(3): 326-329.
- Pritchard, T.J., and Donnelly, C.W. 1999. Combined secondary enrichment of primary enrichment broths increases *Listeria* detection. *J. Food. Prot.* 62: 532-535.
- Raccach, M., and Henningsen, C. 1997. The effect of chloride salts on *Yersinia enterocolitica* in meat. *Food Microbiol.* 14: 431-438.
- Raj, H., and Liston, J., 1961. Survival of bacteria of public health significance in frozen seafoods. *Food Technol.* 15: 429-435.
- Raven, P.H., Evest, R.F. and Eichhorn, S.E. 1999. Biology of plants. Wiltfierman and Co., Worth Publishers.: 549-552.
- Ray, B., Webb, N.B. and Speck, M.L. 1976. Microbiological evaluation of blue crab processing operations. *J. Food Sci.* 41: 398-402.
- Riesco M.B. and Cepeda, E. 1996. Juey. Peces y mariscos comestibles de Puerto Rico. Programa de Colegio Sea Grant UPR-Mayagüez: 71-72.
- Ryser, E.T., and Donnelly, C.W. 2001. *Listeria*. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. APHA Publ. Washington, D.C.: 343-356
- Schlesinger, L. 2002. Florida Fish and WildLife Conservation Commission. Land Crabs. Division of Marine Fishies. September 2002.

- Schuchat, A., Swaminathan, and Broome, C.V. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 169-183.
- Stanley, A. 2004. Incidence of *Listeria* in seafood.
<http://www.web.ukonline.co.uk/anthonystanley/dissonline.html>.
- Surkiewicz, B.F., Campbell, D.F. and Harris, M.E. 1979. Bacteriological survey of frozen Mexican-style foods produced at establishments under federal inspection. *J. Food Prot.* 42: 46-48.
- Taylor, S.L. and Helge, S.L. 2005. Allergen Control. *Food Technol.* 59(2): 40-43, 75.
- Van Arsdel, W.B. and Guadagni. 1959. Time-temperature tolerance of frozen foods. Methods of using temperature histories to estimate changes in frozen food quality. *Food Technol.* 13: 14-17.
- Ward, D.R., and Baj, N.J. 1988. Factors affecting microbiological quality of seafood. *Food Technol.* 3: 88-94.
- Ward, D., Bernard, D., Collette, R., Kraemer, D., Hart, K., Price, R., and Otwell, S. (Eds.) 1997. Hazards Found in Seafoods, Appendix III. In HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Point Training Curriculum, 2nd ed., p. 173-188. UNC-SG-96-02. North Carolina Sea Grant, Raleigh, NC.
- Ward, D.R., Pierson, M.D., and Van Tassell, K.R. 1977. The microflora of unpasteurized and pasteurized crabmeat. *J. Food Sci.* 42: 597-600.
- Webb, N.B., Stokes, S.J., Thomas, F.B., Moncol, D.B. and Hardy, E.R. 1973. Effect of sanitation procedures on bacterial levels in blue crab processing plant. *Proc. Gulf and Caribbean Fish. Inst.* 25 Annu. Session: 109-111.
- Weitzman, I., Cook, O.D., and Massey, J. 2001. Investigation of foodborne illness outbreak. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.* 4th ed. APHA Publ. Washington, D.C.: 257-266.
- Wenz, B.A., Duran, A.P., Swartzentruber, A., Schwab, A.H. and Read, R.B. Jr. 1983. Microbiological quality of fresh blue crabmeat, clams and oysters. *J. Food Prot.* 46: 978-981.
- Williams, R.R., Wehr, H.M., Stroup, J.R., Park, M. and Poindexter, B.E. 1980. Effect of freezing and laboratory procedures on the recovery of bacteria from ground beef. *J. Food Sci.* 45: 757-759, 764.

Apéndice 1: Proceso de manufactura de las alcapurrias de jueyes

Paso 1: Extracción carne de jueyes



Foto: www.oar.noaa.gov

Paso 4: Se le da forma cilíndrica a la masa y se procede a freír en aceite hasta que dore



Paso 2: Preparación de la masa



Paso 5: Se colocan en la vidriera (vitriera) hasta el momento de venderlas



Paso 3: Colocación de la carne guisada de jueyes (relleno) sobre la masa



Apariencia del Producto final



Foto: Jochi Melero Muñoz
(Puerto Rico, La gran cocina del caribe)

Apéndice 2: Enfermedades de notificación obligatoria según el Departamento de Salud de Puerto Rico

2A. Enfermedades entéricas de notificación obligatoria en Puerto Rico 1999-2003



Yaniré García Guadalupe, MPH
Bioestadística
División de Epidemiología

Estado Libre Asociado de Puerto Rico
Departamento de Salud

Phone. (787) 773-0600 ext.251
Cel. (787) 485-2830
Fax. (787) 773-0622
E-mail: ygarcia@salud.gov.pr



Estado Libre Asociado de Puerto Rico
Departamento de Salud
División de Epidemiología

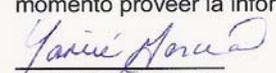
Enfermedades Entéricas de Notificación Obligatoria Puerto Rico, 1999-2003

Enfermedad	Número de casos				
	1999	2000	2001	2002	2003
Amebiasis	0	1	1	1	4
Campylobacteriosis	24	38	39	38	35
Cólera	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> 0157:H7	9	7	2	1	3
Giardiasis	15	24	40	88	364
Hepatitis A	418	255	258	242	102
Listeriosis	0	0	0	2	0
Salmonelosis	715	742	972	660	798
Shigelosis	141	39	21	31	33
Yersiniosis	7	2	2	6	4

Fuente: Sistema de Vigilancia Enfermedades Transmisibles

Las enfermedades de notificación obligatoria tienen como base legal la Ley 81 del 14 de marzo de 1912, según enmendada. La lista de enfermedades notificables aparecen en la Orden Administrativa Núm. 177. Adjunto este documento.

Al momento la información solicitada de brotes por Intoxicación alimentaria la información está de forma manual y no computadorizada, lo que dificulta en este momento proveer la información.


 Yaniré García, MPH
 Bioestadística

* P O Box 70184 . San Juan, P.R. 00936 Tel. 787-274-5527 Fax 787-274-5526

2B. Enfermedades entéricas de notificación obligatoria en Puerto Rico 2001-2002
(Boletín Epidemiológico, vol. 19, num.2)

Volúmen 19, Núm 2

PAGINA 4

Enfermedades de Notificación Obligatoria, Puerto Rico, 2001-2002

Enfermedad o Agente Etiológico	Años			
	2001		2002*	
	Núm.	Tasa por 100,000	Núm.	Tasa por 100,000
Amebiasis	1	0.03	3	0.08
Campylobacter	39	1.02	33	0.87
Ciguatera	8	0.21	15	0.39
Conjuntivitis	13,830	363.12	8356	219.40
E. Coli O157:H7	2	0.05	0	0
Encefalitis primaria	1	0.03	0	0
Encefalitis post varicela	1	0.03	0	0
Fiebre escarlatina	2	0.05	1	0.03
Gastroenteritis	75,919	1993.35	62,555	1642.46
Giardiasis	40	1.05	82	2.15
Hepatitis A	258	6.77	205	5.38
Hepatitis B	297	7.80	171	4.49
Hepatitis no A no B	1	0.03	0	0
Histoplasmosis	1	0.03	0	0
Legionelosis	2	0.05	0	0
Leptospirosis	4	0.11	5	0.13
Listeriosis	0	0	2	0.05

Continúa...

Continuación
Enfermedades de Notificación Obligatoria, Puerto Rico, 2001-2002

Enfermedad o Agente Etiológico	Años			
	2001		2002*	
	Núm.	Tasa por 100,000	Núm.	Tasa por 100,000
Malaria	7	0.18	0	0
Meningitis aséptica	72	1.90	40	1.05
Meningitis por <i>Haemophilus influenzae</i>	2	0.05	1	0.03
Meningitis por <i>Streptococcus pneumoniae</i>	11	0.29	1	0.03
Meningitis por otras bacterias	28	0.66	14	0.37
Meningitis meningocócica	9	0.24	7	0.18
Mononucleosis	13	0.34	41	1.08
Paperas	1	0.03	1	0.03
Rabia animal	98	2.57	87	2.28
Salmonelosis	972	25.5	508	13.33
Sarampión alemán	3	0.08	0	0
Sarampión común	1	0.03	0	0
Shigelosis	21	0.55	33	0.87
Tétanos	0	0	3	0.08
Síndromes gripales e Influenza	179,215	4705.52	120,497	3163.81
Tos ferina	0	0	0	0
Varicela	2,186	57.40	906	23.79
Yersiniosis	2	0.05	2	0.05



Estado libre asociado de Puerto Rico
 Departamento de Salud

Anejo A

**Enfermedades y/o Condiciones de Salud notificables
a partir del 1ero de marzo de 2004***

Enfermedades, Patógenos y/o Condiciones de Salud	Categoría I (5 días)	Categoría II (semanal)	Categoría III (inmediato)
ALERTA Cualquier enfermedad o condición no usual¹			√
Amebiasis (<i>Entamoeba histolytica</i>)	√		
Brote ² de cualquier enfermedad			√
Campylobacteriosis	√		
Botulismo			√
<i>Chlamydia Trachomatis</i>			√
Cólera			√
Conjuntivitis ³		√	
Creutzfeldt-Jacob (CJD)			√
Dengue	√		
Dengue Hemorrágico	√		
Difteria			√
<i>E. coli</i> O157: H7	√		
• "Shiga toxin positive, serogroup non-O157"	√		
Encefalitis			√
Enfermedad pélvica inflamatoria (PID)	√		
Fiebre del Nilo (West Nile Virus)			√
Fiebre Tifoidea (<i>Salmonella typhi</i> , serogrupo D)	√		
Gastroenteritis		√	
Gonorrea			√
Giardiasis	√		
<i>Haemophilus influenzae</i> , infección, invasivo			√
Hepatitis viral ³	√		
Hepatitis B Perinatal	√		
Herpes simplex, genital	√		
Histoplasmosis	√		
Influenza	√		
Intoxicación alimentaria ⁴			√
Legionelosis	√		

* Todas estas condiciones son reportables por los directores de laboratorios, médicos y directores de facilidades de cuidado médico o sus designados. Los **cánceres** y la **enfermedad de Alzheimer** también son reportables; contactar el Registro Central de Cáncer al (787) 274-3349 o al Registro de Casos de la Enfermedad de Alzheimer al (787) 274-3358 / 274-5639

¹ Incluye aquellas condiciones que sugieren la posibilidad de bioterrorismo tales como: Antrax, Viruela, Peste Bubónica, Brucelosis, Tularemia, Fiebre Q, Fiebre Bubónica, Fiebre Virales Hemorrágicas (e.g. Ebola, Marburg), Glanders, Toxina Ricin, Virus Hanta, Virus Nipah.

² Es la ocurrencia de un número de casos mayor al esperado de enfermedad en un área en particular, en un período específico de tiempo.

³ Incluye tipo A, B, C, D (delta), E, no-específica y no-A no-B

⁴ El diagnóstico de intoxicación alimentaria debe ser considerado cuando dos (2) o más personas que han compartido una comida desarrollan una enfermedad aguda que puede presentar con náusea, vómitos, diarrea, síntomas neurológicos y otras manifestaciones extraintestinales.

Leptospirosis			√
Lepra	√		
Listeriosis	√		
Malaria			√
Meningitis ⁵			√
Monkey Pox			√
Mordedura de Animal ⁶			√
<i>Neisseria meningitidis</i> (meningococo)			√
Paperas			√
Poliomielitis			√
Rabia, animal			√
Rabia, humana			√
Salmonelosis	√		
Sarampión alemán	√		
Sarampión común			√
Shigelosis	√		
SIDA	√		
Sífilis	√		
Síndromes gripales		√	
Síndrome Agudo Respiratorio Severo (SARS)			√
<i>Staphylococcus aureus</i> con sensibilidad disminuida a Vancomicina ⁷			√
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , infección, invasivo ⁸	√		
Tétano			√
Tos Ferina (Pertussis)			√
Tuberculosis (enfermedad solamente, no incluye infección latente)	√		
VIH, adultos	√		
VIH, pediátrico (<13 años).	√		
Virus sincitial respiratorio	√		
Varicela			√

LEYENDA:**Categoría I:**

➔ Completar el informe individual de casos especificando la enfermedad y enviarlo a la División de Epidemiología del Departamento de Salud, en un periodo no mayor de cinco (5) días.

Categoría II:

➔ Cada caso de estas enfermedades deberá anotarse en el informe de categoría II por edad y municipio; semanalmente se enviará a la División de Epidemiología del Departamento de Salud.

Categoría III:

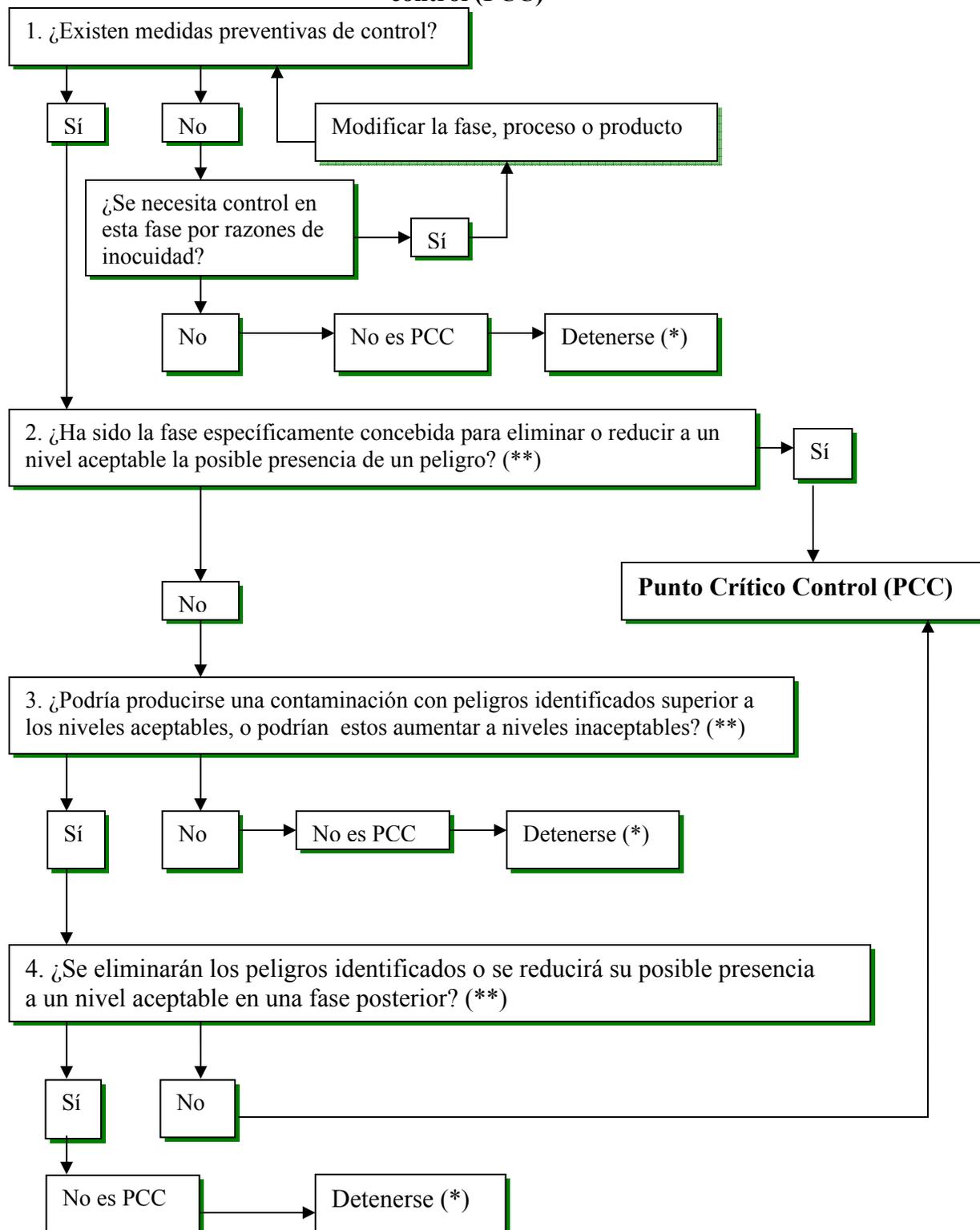
⁵ Incluye meningitis aséptica y meningitis por un agente confirmado (viral, bacteriana, hongo, parásito, otro; especificar organismo).

⁶ Mangosta, perro, gato, caballo, mono, vaca, cerdo, becerro, toro, murciélago, cabra u otro animal que pueda transmitir la rabia.

⁷ La disminución en sensibilidad a Vancomicina para *Staphylococcus aureus* se define de acuerdo con los métodos aprobados por el Comité Nacional par Estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS) por una MIC para Vancomicina ≥ 8 microgramos/mL. Deberán guardarse las cepas aisladas par posterior envío al Instituto de Laboratorios del Departamento de Salud para realizar estudios de confirmación.

⁸ Incluye Tipos: A, B, C, D (delta). E. no-específica v no-A no -B

Apéndice 3: Ejemplo de un árbol de decisiones para identificar los puntos críticos de control (PCC)



- (*) Proseguir al siguiente peligro identificado del proceso descrito
- (**) Los niveles aceptables o inaceptables necesitan ser definidos teniendo en cuenta los objetivos globales cuando se identifican los PCC del plan HACCP..