

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Bacillus cereus* EN
ARROZ COCIDO EN LAS CAFETERÍAS DE LOS CENTROS
REGIONALES DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE
GUATEMALA**

INGRID YESSENIA SILVA DURÁN

QUÍMICA BIÓLOGA

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2011

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Bacillus cereus* EN
ARROZ COCIDO EN LAS CAFETERÍAS DE LOS CENTROS
REGIONALES DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE
GUATEMALA**

**INFORME DE TESIS
PRESENTADO POR**

INGRID YESSENIA SILVA DURÁN

**PARA OPTAR A EL TÍTULO DE
QUÍMICA BIÓLOGA**

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2011

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph. D.

Decano

Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M. A.

Secretario

Licda. Liliana Vides de Urizar

Vocal I

Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares

Vocal II

Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli

Vocal III

Br. José Roy Morales Coronado

Vocal IV

Br. Cecilia Liska de León

Vocal V

AGRADEZCO

A mi Dios, por situar en mi camino a todas las personas que han contribuido en mi formación personal y académica.

A Guatemala, mi patria.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala, casa de estudios que brinda el pan del conocimiento al pueblo de Guatemala.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por darme las bases y principios para ser una profesional.

Al Laboratorio de Microbiología de los Alimentos por facilitarme los medios para la realización de esta investigación.

A mis catedráticos y ayudantes de cátedra cuyos consejos fueron palabras mágicas que alimentaron mi saber.

A mi asesora: Licenciada Brenda López, gracias por instruirme, dirigirme y apoyarme.

A mis revisoras: Licda. Vivian Matta y Dra. Patricia Saravia cuyas correcciones enriquecieron este trabajo de investigación.

Al Licenciado Juan Carlos Quevedo (Q.E.P.D.) con gigantesca gratitud.

ACTO QUE DEDICO

A Dios

Por ser la fuente de toda sabiduría, la luz y guía en el sendero de mi vida, porque él es mi fortaleza en los momentos más difíciles y por permitirme llegar a este momento que esperé con tanta Fe y alegría.

A mis padres

Adolfo Jaime Silva (Q.E.P.D.) y Marta Consuelo Durán Ramírez por darme la vida y enseñarme que la dedicación y trabajo duro dan las mayores recompensas en la vida.

A mis hermanos

Jorge Manuel y Jaime Silva por compartir conmigo momentos maravillosos que jamás olvidaré en donde sobresale el amor, apoyo, amistad, confianza y alegría que nos une como familia.

A mi compañero de vida

Soren Ramírez agradezco tu amor, comprensión y apoyo, gracias por estar en las buenas y en las malas conmigo.

A mis Abuelos

Matilde, Alejandro, Paula y Manuel (Q.E.P.D.) gracias por darme su apoyo, amor y sabios consejos, me enseñaron a ser una persona honesta, responsable y trabajadora, que Dios los tenga en su Gloria.

A mis tías

Antonieta y Aracely por estar siempre al pendiente de mí y darme ánimos para seguir adelante

A mis Amigos

Ana Liz, Nytzia, July, Marvin, Gilda, Ana y Sheila, gracias chicos por nunca dejar que tirara la toalla y por estar a mi lado, los quiero mucho.

A mis Catedráticos

En especial a la Licenciada Brenda López quien es una gran persona y una gran profesional y por eso la respeto y admiro.

INDICE

	Pagina
I. RESUMEN	01
II. INTRODUCCION	03
III. ANTECEDENTES	05
A. Historia de Enfermedades transmitidas por los alimentos	05
B. Tipo de ETA´s	05
C. Condiciones de contaminación	06
1. Temperatura y ambiente	06
2. Alimentos y humedad	07
3. Actividad del agua	08
4. Tiempo	09
D. Contaminación del alimento	09
E. Factores que posibilitan la aparición de las ETA´s	10
F. Prevención de ETA´s	10
1. Normativa MERCOSUR	11
2. SENASA	12
3. SAGPA	12
4. Directiva 93/43/CEE	12
5. Codex alimentarius	13
6. Buenas prácticas de manufactura	14
G. Características de <i>Bacillus cereus</i>	15
1. Características	15
2. Clasificación taxonómica	15
3. Diferenciación	16
4. Bioquímica	16
H. Alimentos implicados	17
I. Patogenia y cuadro clínico	17
1. Síntomas	18

J. Diagnóstico	19
K. Epidemiología	20
L. Métodos de identificación	22
M. Medidas de control	23
N. Almacenamiento de los alimentos	24
1. Enfriado	24
2. Recalentamiento	25
IV. JUSTIFICACION	26
V. OBJETIVOS	27
VI. HIPÓTESIS	28
VII. MATERIALES Y METODOS	29
VIII. RESULTADOS	36
IX. DISCUSION DE RESULTADOS	40
X. CONCLUSIONES	42
XI. RECOMENDACIONES	43
XII. REFERENCIAS	44
XIII. ANEXOS	51

I. RESUMEN

Bacillus cereus es una bacteria esporoformadora que se encuentra comúnmente en cantidades pequeñas en algunos alimentos como el arroz. Sin embargo después del cocimiento, en ciertas condiciones inadecuadas de enfriamiento y refrigeración las esporas sobrevivientes pueden reproducirse rápidamente y producir enterotoxinas, convirtiendo al alimento en potencial causa de intoxicación alimenticia.

El presente estudio se realizó en los diez centros regionales de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC), con el fin de detectar y cuantificar la presencia de *Bacillus cereus* en el arroz cocido preparado en las cafeterías de dichos centros. Para tal propósito el trabajo se dividió en dos partes: en la primera se obtuvo la información por medio de una encuesta y observación directa. La encuesta fue dirigida a los manipuladores y dueños de las cafeterías con el fin de investigar la presencia de condiciones favorables para la proliferación de *Bacillus cereus*, como lo son el espacio de tiempo transcurrido entre la preparación y el almacenaje, la cantidad de arroz que se prepara, el recipiente en donde se almacena y en la utilización de una refrigeradora o de un enfriador para el almacenaje del arroz después de su cocción. La segunda parte consistió en tres muestreos y la cuantificación microbiológica de las colonias de *Bacillus cereus*, por el método de recuento en placa en las muestras de arroz cocido preparado en las cafeterías de los diez centros regionales. Las muestras analizadas se obtuvieron aleatoriamente en las cafeterías de cada uno de los diez centros regionales. Se procesó una muestra de cada cafetería por mes, durante los meses de septiembre a noviembre del año 2006.

A partir de los datos analizados se determinó estadísticamente que la cantidad de arroz que se prepara, la frecuencia con que se sirve, el tiempo que se tarda en almacenar después de su cocción y el lugar donde se almacena después

de su cocción, fueron las causas de proliferación de *Bacillus cereus* en los centros regionales (CUNSUR, CUNORI, CUDEP, CUNSURORI, CUNOR, CUNOROC).

Los resultados obtenidos a partir del análisis microbiológico establecieron que el 50% (15 de 30) de las muestras estudiadas fueron positivas a la presencia de *Bacillus cereus*. De ellas, el 80% (12 de 15) superan el límite máximo establecido por *Codex alimentarius*.

En cinco centros regionales (CUNSUR, CONSURORI, CUNORI, CUDEP y CUNOR) se obtuvo dos o más conteos arriba del límite máximo establecido por *Codex Alimentarius* (1×10^4 Ufc/g de *Bacillus cereus*) por lo que se considera que el consumo de dicho alimento es peligroso para la salud del consumidor y un riesgo potencial de sufrir intoxicación alimenticia; por ello se estableció que es de suma urgencia que se lleve a cabo la intervención y vigilancia de las autoridades de la Universidad de San Carlos de Guatemala en dichos centros, así como implementar las acciones correctivas y preventivas para que los estudiantes ingieran alimentos inocuos.

Con estos resultados se concluye que es necesario establecer estudios de rutina para identificar y cuantificar *Bacillus cereus* en arroz cocido preparado en las cafeterías de los 10 centros regionales de la Universidad de San Carlos de Guatemala y brindar al manipulador capacitaciones sobre buenas prácticas de manufactura (BPM).

II. INTRODUCCION

Pocas personas saben que los alimentos que consumen todos los días pueden causarles enfermedades transmitidas por alimentos (ETA`s). Los padecimientos transmitidos por los alimentos pueden reconocerse sólo cuando ocurre un brote y varias personas experimentan una enfermedad similar al ingerir un alimento en común, a determinado tiempo posterior de su ingestión. Así ocurre con *Bacillus cereus*, el cual a pesar de encontrarse a menudo en cantidades pequeñas en muchos alimentos, se considera un riesgo de intoxicación cuando se encuentra en concentraciones mayores de 1×10^3 Ufc/g de muestra (8-9).

La enfermedad alimentaria ocasionada por *Bacillus cereus* se presenta después de la ingestión de alimentos en los que se ha multiplicado el organismo y formado sus toxinas. Habitualmente, se describen dos síndromes asociados, el diarreico, caracterizado por una diarrea que aparece entre 8 y 24 horas después de la ingestión de grandes cantidades de células, y el síndrome emético, con episodios de vómitos que aparecen entre una y seis horas después de la ingestión de la toxina que se encuentra preformada ya en el alimento.

Los alimentos pueden jugar un papel importante en la transmisión de enfermedades de origen alimentarlo y constituyen un problema de salud pública importante. Se consideran como la mayor causa de morbilidad, tanto en países industrializados como en vías de desarrollo, y en estos últimos son causa frecuente de mortalidad. La magnitud del impacto socio-económico que generan estas enfermedades es difícil de medir, más aún cuando muchos casos ni siquiera son informados.

En Guatemala, el departamento de epidemiología del Ministerio de Salud y Asistencia Social reportó 492 casos de brotes de intoxicación por alimentos en el año 1999 y 1,061 casos en el año 2000. En ese mismo año, la Organización

Panamericana de la Salud reportó 469.705 casos y notificó que las ETA's fueron la segunda causa de morbilidad en Guatemala. Este informe mostró que los principales agentes identificados fueron *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *V. cholerae* y *E. coli* (1-4).

En la Universidad de San Carlos de Guatemala cada año hay un incremento en la población estudiantil, con ello un aumento del consumo de alimentos en las cafeterías autorizadas. Es por ello que se han tomado varias iniciativas para regular el manejo, venta y distribución de los alimentos. Se han realizado estudios de inocuidad alimentaria en las cafeterías de Campus Central y Centro Universitario Metropolitano (CUM) determinando que no existen condiciones higiénicas apropiadas para la preparación de los mismos, evidenciado por la presencia de bacterias patógenas y no patógenas en los alimentos (62). Debido a que no existen estudios realizados en los centros regionales, se planteó la necesidad de ampliar la investigación de inocuidad y Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para determinar la calidad microbiológica y las condiciones higiénicas para la manipulación correcta de los alimentos en los expendios que atienden a los estudiantes en las cafeterías de dichos centros.

El objetivo de esta investigación fue determinar y cuantificar la presencia *Bacillus cereus*, así como también identificar las condiciones que contribuyen al crecimiento de dicha bacteria en el arroz cocido preparado por los diversos expendios de las cafeterías de los diez centros regionales.

III. ANTECEDENTES

A. Historia de enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) se conocen desde épocas muy remotas. En el 2000 a.C. Moisés había dictado leyes sobre los alimentos que se podían comer y los que se debían rechazar, así como también estaban legislados los métodos de preparación y la importancia de la limpieza de las manos antes de ingerir los alimentos (3,4).

Generalmente los relatos de intoxicaciones alimentarias que registra la historia antigua se atribuían a productos químicos venenosos, a veces incorporados deliberadamente. Recién en el siglo XIX se tuvo conocimiento de las enfermedades alimentarias producidas por gérmenes (3, 4).

Las ETA's son aquellas que se originan por la ingestión de alimentos infectados con agentes contaminantes en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor. Sean sólidos naturales, preparados o bebidas simples como el agua, los alimentos pueden originar dolencias provocadas por patógenos, tales como bacterias, virus, hongos, parásitos o componentes químicos, que se encuentran en su interior (3, 4).

B. Tipo de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA's)

Las enfermedades transmitidas por alimentos pueden manifestarse a través de infecciones las cuales son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos vivos perjudiciales. Por ejemplo: salmonelosis, hepatitis viral tipo A y toxoplasmosis (3, 4).

Las intoxicaciones son las ETA's producidas por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas o animales o de productos metabólicos de microorganismos en los alimentos, o por sustancias químicas que se incorporan a

ellos de modo accidental, incidental o intencional desde su producción hasta su consumo. Ocurren cuando las toxinas o venenos de bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido. Estas toxinas generalmente no poseen olor o sabor y son capaces de causar enfermedades después que el microorganismo es eliminado. Algunas toxinas pueden estar presentes de manera natural en el alimento, como el caso de ciertos hongos que producen toxinas y animales como por ejemplo el pez globo (3, 4).

Toxi-infecciones son enfermedades causadas por ingerir alimentos contaminados con una cierta cantidad de microorganismos patógenos, los cuales son capaces de producir o liberar toxinas una vez que son ingeridos y producen dolores abdominales, diarreas, vómitos y náuseas acompañadas de fiebre (10, 42).

Un brote por ETA's sucede cuando dos o más personas sufren una enfermedad similar, después de ingerir un mismo alimento y los análisis epidemiológicos o de laboratorio, lo señalan como el origen de ese malestar. Mientras que, un caso de ETA's se produce cuando una sola persona se ha enfermado después del consumo de alimentos contaminados, según lo hayan determinado los análisis epidemiológicos o de laboratorio (3, 4, 5, 10).

C. Condiciones para la contaminación

1. Temperatura y ambiente

La mayoría de las bacterias del ambiente se desarrollan más rápido a temperaturas moderadas (bacterias mesófilas entre 16 °C a 44 °C), aunque algunas también son capaces de reproducirse o adaptarse al frío (bacterias psicrófilas que se reproducen con la máxima facilidad entre 12 °C a 15 °C) y sobrevivir dentro del refrigerador, mientras que otras necesitan cierta intensidad de calor para multiplicarse (bacterias termófilas requieren temperatura mayor de 45 °C). El frío del refrigerador hace más lenta la multiplicación de las bacterias pero no alcanza la destrucción de las mismas, mientras que cuando hay un choque térmico se puede

frenar totalmente el desarrollo bacteriano al impedir que el agua sea utilizada. Hay que tomar en cuenta que cuando se lleva a cabo el descongelamiento recomienza la multiplicación. Por lo mencionado, para prevenir su crecimiento, la temperatura de los alimentos en conservación debe mantenerse a 5°C y por encima de los 65°C durante la cocción. Los alimentos congelados deben mantenerse a -18°C y para la descongelación del mismo, lo más apropiado es trasladar el alimento al refrigerador con 12 horas de antelación. El rango que va entre las dos (30°C a 65°C) temperaturas es conocido como una zona peligrosa para consumir alimentos (1, 6, 10).

2. Alimentos y humedad

La humedad relativa y la actividad de agua están relacionadas entre sí, de modo que la humedad relativa es esencialmente una medida de la actividad del agua de la fase gaseosa. Cuando se almacenan alimentos que contienen una actividad de agua baja en una atmósfera de humedad relativa elevada, el agua pasará desde la fase gaseosa al alimento. Es posible que transcurra mucho tiempo para que la masa del alimento aumente su actividad del agua, pero puede haber una condensación en las superficies que origine zonas localizadas de elevada actividad de agua. Es en estas zonas en las que los propágulos, que han permanecido viables pero no han sido capaces de crecer, pueden ahora germinar y crecer. Una vez los microorganismos han empezado a crecer y son activos desde el punto de vista fisiológico, habitualmente producen agua como producto final de la respiración. Así aumenta la actividad de agua de su propio medio ambiente inmediato de modo que finalmente los microorganismos que necesitan una actividad de agua elevada son capaces de crecer y alterar un alimento que en un principio era considerado estable en el aspecto microbiológico (1, 6, 18).

3. Actividad del agua (a_w)

Se denomina actividad del agua (a_w), a la presión de vapor de agua del alimento (P) respecto a la presión de vapor de agua pura (P_0). El valor de la actividad de agua nos da una idea de la cantidad de agua disponible metabólicamente en los alimentos. Así como este se encuentra relacionado con la humedad relativa (HR). Cuando un microorganismo se encuentra en un sustrato con una actividad de agua menor que la que necesita, su crecimiento bacteriano se detiene. Esta detención del crecimiento no suele llevar asociada la muerte del microorganismo, sino que éste se mantiene en condiciones de resistencia, durante un tiempo más o menos largo. Por ejemplo en el caso de las esporas, la fase de resistencia puede ser considerada prácticamente ilimitada (1, 6, 18).

La gran mayoría de los microorganismos requieren valores de actividad de agua muy altos para poder crecer. De hecho, los valores mínimo de actividad para diferentes tipos de microorganismos como las bacterias que contienen una $a_w > 0.90$, levaduras $a_w > 0.85$, hongos filamentosos $a_w > 0.80$. Como puede verse, los hongos filamentosos son capaces de crecer en sustratos con una actividad de agua mucho menor (mucho más secos) de lo que permite el crecimiento de bacterias o de levaduras. Por esta razón se puede producir deterioro de los alimentos de baja actividad de agua (por ejemplo, el queso o almíbares) por mohos (hongos filamentosos) y no por bacterias. Por debajo de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ la disminución de la actividad del agua es mucho más drástica. Los alimentos que se someten a la congelación van a tener la misma actividad de agua indiferentemente de la composición del alimento. Hay algunos alimentos en los que la actividad de agua es tan baja que no varía al congelarlos porque no puede bajar más lo que hace que el alimento sea perecedero. (1, 6, 18).

4. Tiempo

Dependiendo de las condiciones de almacenaje (refrigerantes, armarios, alacenas, etc.) tipo de alimento, humedad y temperatura, algunas bacterias se dividen cada 20 minutos. Si se da el tiempo suficiente, es posible que un pequeño grupo de bacterias se incremente hasta alcanzar un número importante, capaz de provocar una contaminación alimentaria. Por esa razón, es esencial que los alimentos de alto riesgo no permanezcan a la temperatura de la zona de peligro, (36°C a 56°C) más que lo necesario (1, 6, 10).

D. Contaminación del alimento

La contaminación puede ser de tipo físico, biológico y químico. La contaminación física como por ejemplo metales y compuestos puedan pasar a los alimentos mediante el contacto directo de utensilios, envolturas, recipientes o superficies de apoyo. La contaminación biológica se debe a microorganismos patógenos que están en el medio ambiente o son transferidos por animales infectados. La contaminación química se debe a la presencia de sustancias tóxicas para el hombre. En muchos alimentos se ha detectado la presencia de plaguicidas, insecticidas y venenos (6, 8).

La contaminación puede producirse en cualquiera de las etapas de transformación que sufre un alimento hasta llegar a la mesa: producción de materia prima, elaboración, conservación, transporte, distribución y almacenamiento (6, 9).

Una defectuosa preparación, cocción o almacenamiento de un alimento, son las principales causas para la aparición de las bacterias en cualquier plato de comida, que comienzan a multiplicarse y hacen que el consumo del alimento sea peligroso para la salud (6,9).

La presencia de bacterias no siempre se hace visible en los alimentos, no siempre presentan cambios de sabor, olor o, incluso, alteraciones en su aspecto (6, 9).

E. Factores que posibilitan la aparición de ETA's

Se puede mencionar los siguientes (1-5)

- i Manipulador de alimentos enfermo
- ii Falta de Higiene personal
- iii Uso de agua no potable
- iv Contacto de alimentos con equipo sucio
- v Manipulación inadecuada de los alimentos
- vi Contaminación cruzada
- vii Presencia de insectos o roedores
- viii Cocción o recalentamiento incorrectos
- ix Conservación a temperatura no apropiada
- x Contacto de alimento con productos químicos
- xi Pérdida de cadena de frío

F. Prevención de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA's)

El objetivo primario de la inocuidad de los alimentos es proteger la salud pública frente a riesgos asociados con los alimentos lo más efectivamente posible a través de la implementación de medidas adecuadas (8, 28).

Los hábitos alimentarios en las zonas urbanas, están cambiando mundialmente y en nuestro país se puede ver este fenómeno en los locales de expendios de comida rápida. Debido a esto la calidad de los alimentos van disminuyendo su calidad en bares y restaurantes tradicionales. Todos estos cambios han llevado a plantear una nueva estrategia de monitoreo y control en este tipo de negocios de comida rápida (9, 10, 30).

Es por ello que la búsqueda y cuantificación de microorganismos como *Bacillus cereus* pasa a ser una necesidad, para prevenir y minimizar posibles brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos. Los productores, los procesadores y los comerciantes de alimentos deben operar según los principios de las buenas prácticas de agricultura/higiene/manufactura siendo fundamental educar en estas áreas a nuestra población. Las buenas prácticas de manufactura (BPM) son procedimientos de higiene y manipulación, que constituyen los requisitos básicos e indispensables para participar en el mercado (9,10, 30).

1. Normativa Mercosur

La legislación vigente define a las BPM como los procedimientos necesarios para lograr alimentos inocuos, saludables y sanos. Esta normativa es de aplicación en todos los establecimientos elaboradores de alimentos que comercialicen sus productos en el ámbito del mercado común y constituyen los procesos exigidos en lo que se refiere a: (9-10, 30).

- a. Establecimientos: Incluye las instalaciones, diseño, construcción, zonas de manipulación de alimentos, vestuarios, abastecimiento de agua, Iluminación, ventilación y equipos (9, 10, 30).
- b. Limpieza y desinfección: Incluye productos, precauciones y aseo del personal (9-10, 30).
- c. Higiene durante la elaboración: Incluye requisitos de la materia prima, prevención de contaminación, empleo del agua, operaciones de elaborado y envasado (9-10, 30).
- d. Dirección y supervisión: Juzgar los posibles riesgos, vigilancia y supervisión eficaz (9-10, 30).

- e. Documentación: Requisitos de elaboración, producción y distribución (9-10, 30).
- f. Almacenamiento y transporte: Impedir contaminación y proliferación de microorganismos, vehículos autorizados con temperatura adecuada (9-10, 30).
- g. Controles de laboratorio: Métodos analíticos reconocidos (9-10, 30).

2. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)

Para todos los establecimientos donde se destazan animales o se elaboren, fraccionen o depositen alimentos, el SENASA define y aplica las buenas prácticas de manufactura (BPM) así como también los Procedimientos Operativos Estandarizados (POES), que describen los métodos de saneamiento diario que deben ser cumplidos por los establecimientos, antes (saneamiento preoperacional) y durante (saneamiento operacional), que impidan la contaminación o alteración de los productos. Estos Procedimientos Operativos deben estar firmados por el encargado y ser presentados ante el SENASA (9-12, 30, 42, 43).

3. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPA)

Aplica la Guía de Buenas Prácticas de Higiene y Agrícolas para la Producción de Hortalizas Frescas, que contiene los principios esenciales de higiene para productos hortícolas frescos (cultivo-cosecha), así como su empaque, almacenamiento y transporte (9-12, 30).

4. Directiva 93/43/CEE

Sobre las normas generales de higiene de productos alimenticios y las modalidades para la verificación de la observancia de dichas normas. Define la higiene de los productos alimenticios como las medidas necesarias para garantizar

la seguridad y salubridad de los productos alimenticios. Estas medidas cubren la producción primaria, preparación, transformación, fabricación, envasado, almacenamiento, transporte, distribución, manipulación y venta o suministro al consumidor. Establece asimismo, que las empresas del sector alimenticio deben indicar cualquier fase de su actividad que sea determinante para garantizar la seguridad de los alimentos y velar porque se definan, se pongan en práctica, se cumplan y se actualicen procedimientos de seguridad adecuados, de acuerdo a los principios en que se basa el sistema HACCP (Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control). En base a esta directiva, los Estados Miembros deben fomentar la elaboración de guías de prácticas correctas de higiene, sobre las cuales se basan los controles realizados por las autoridades competentes. Estos controles incluyen una evaluación general de los riesgos que potencialmente presentan las actividades de la empresa para la seguridad alimentaria (9-12, 30).

5. Código Internacional recomendado de prácticas - Principios generales de higiene de los alimentos (CODEX ALIMENTARIUS)

En este código se plasma las opiniones de todos los países de todo el continente y la principal medida es el manejo adecuado de los alimentos. Si los alimentos se preparan de modo que la temperatura se mantenga entre 30 °C y 50 °C se permite la proliferación vegetativa, cuando se las deja enfriar de forma lenta, las esporas se multiplican y elaboran la toxina (12, 13).

Las esporas resistentes al calor sobreviven a la ebullición y germinan, esto sucede cuando el arroz hervido se deja fuera de la heladera. La fritura rápida o el recalentamiento breve a temperaturas bajas antes de servir el alimento no son adecuados para destruir la toxina termoestable preformada (14, 15).

El enfriamiento rápido y la refrigeración de alimentos, preparado en grandes cantidades, contribuyen en forma decisiva a prevenir la enfermedad. En cualquier caso, la aparición de la enfermedad implica la ingestión del alimento contaminado

con las suficientes bacterias o toxinas para vencer la resistencia del huésped (14, 15).

Las informaciones epidemiológicas indican que entre los factores más importantes relacionados con la aparición de brotes de intoxicaciones alimentarias se encuentran las operaciones inadecuadas que se efectúan luego de la cocción, por ejemplo, si el enfriamiento es demasiado lento esto permite que algunas partes del alimento mantengan temperaturas peligrosas entre 10 °C y 60 °C por más de 4 horas. También el recalentamiento debe ser rápido para que el alimento pase por la franja de temperaturas peligrosas entre 10 °C y 60 °C en el menor tiempo (8). El mantener los alimentos en esta franja de temperaturas constituye lo que se conoce como un punto crítico (9, 11).

6. Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)

Es un conjunto de normas y reglas que se debe cumplir para mantener la inocuidad alimentaria. Entre ellos se pueden mencionar el lavarse bien las manos antes y después de cocinar. Repetir la operación tantas veces como sea necesario, aún en los casos en que no se vea suciedad. Utilizar alimentos de calidad reconocida; verificar si cuentan con controles oficiales que aseguren su inocuidad y calidad (etiquetas de elaboración, fechas de vencimiento). Evitar el uso de alimentos obtenidos de fuentes no confiables (criaderos o frigoríficos clandestinos, leche no pasteurizada o esterilizada, salamis caseros). Lavar bien las verduras y frutas que se consumirán crudas. Asegurar una completa cocción de los alimentos. Consumir de inmediato los alimentos cocidos: Uno de los mayores factores de riesgo lo constituye la preparación de los mismos varias horas antes de su consumo. No conservar los alimentos a temperatura ambiente o tibia, porque facilita la multiplicación de microorganismos. Refrigerar de inmediato los alimentos que no se vayan a consumir en el momento. Si hay que recalentar alimentos, hacerlo a temperaturas elevadas (mayores a 65°C), procurando que dicha temperatura llegue a todo el alimento. Evitar el contacto entre alimentos crudos y cocidos. Limpiar y desinfectar la cocina y los utensilios que se utilizan para la preparación de alimentos.

Utilizar, en todos los casos, agua segura. Si la misma no inspira confianza, hervirla durante 3 minutos (1, 2, 5-7).

G. Características de *Bacillus cereus*

1. Características

Es un bacilo Gram positivo móvil de aproximadamente 1.0 a 1.2 μm de ancho y de 3 a 5 μm de largo, esporoformador, aeróbio facultativo. En cultivos jóvenes y a medida que envejece puede verse como un Gram positivo variable o Gram negativo variable. Crece a temperaturas entre 5 $^{\circ}\text{C}$ a 50 $^{\circ}\text{C}$ siendo la óptima entre 35 $^{\circ}\text{C}$ a 40 $^{\circ}\text{C}$. Tiene un tiempo de generación corto de 20 a 30 minutos y un resistencia de pH de 4.5 a 9.3. La producción de esporas en presencia de oxígeno es un rasgo que define el género, así como su morfología; éstas pueden estar dentro de la pared bacteriana o pueden deformar la pared. Las esporas son resistentes al calor y a la desecación son inactivadas por métodos físicos como el calentamiento a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos (16-18).

Se relaciona *Bacillus cereus* a *Bacillus mycoide*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus thuringiensis*. Es por ello que la diferenciación de estos microorganismos depende de la determinación de su movilidad (la mayoría de *Bacillus cereus* son móviles), o de la presencia de cristales tóxicos (*Bacillus thuringiensis*), de la actividad hemolítica, en donde *Bacillus cereus* y otros son beta hemolíticos, *Bacillus anthracis* es usualmente no hemolítico. *Bacillus cereus* es también conocido como *Bacillus cereusis*, *Bacillus medusa* y *Bacillus endorhytmos* (16, 19).

2. Clasificación taxonómica

Súper Reino: Bacteria

Reino: *Monera*

Phyllum: *Firmicutes*

Súper Clase: *Bacillus/Clostridium*

Clase: *Bacilli*

Orden: *Bacillales*

Familia: *Bacillaceae*

Género: *Bacillus*

Especie: *cereus*

Nombre científico: *Bacillus cereus*

Los miembros del reino *Monera* se caracterizan por ser procariotas. Además los miembros de la familia *Bacillaceae* tiene forma de bastón (4 géneros) o esféricos (un solo género), forman endosporas y tiene motilidad flagelar. La mayoría de bacterias son Gram positivo y aerobios facultativos. No hay formación de micelio y producen esporas que contienen una célula central (core) envueltas en una corteza de peptidoglucano y una cubierta de esporas en su exterior (16, 19)

3. Diferenciación

Posee la enzima que oxida la catalasa, debido a que *Bacillus cereus* posee lecitinasa la cual tiene actividad sobre la yema de huevo, produce un resultado positivo en la prueba de Voges-Proskauer, el crecimiento en medios de cultivo es aeróbico, no hay producción de ácido ni gas a partir de glucosa, lleva a cabo la reducción de nitratos a nitritos y no crece a temperatura de 50⁰ C (1, 2).

4. Bioquímica

Bacillus cereus es un microorganismo útil en la biotecnología, ya que según investigaciones llevadas a cabo, posee habilidad de producir algunas enzimas muy importantes, las cuales son secretadas; entre estas están la α -amilasa y β -amilasa. Además produce antibióticos como Bu-2349 A y B, antibióticos Cp-3, insecticidas, β -lactamasas, penicilinas, polinucleótido de fosforilasa y oxidasa de urea (23).

Por ejemplo, la similitud que existe entre *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis* ha permitido la transferencia de plásmidos del cuerpo paraesporal de *Bacillus thuringiensis* a *Bacillus cereus*. Los cuerpos paraesporales son cristales de moléculas proteínicas de gran peso molecular que contienen α -endotoxinas, las cual son tóxicas para las larvas de las diferentes especies de animales y por tanto pueden ser utilizados como insecticidas (22, 23).

H. Alimentos implicados

Bacillus cereus está muy difundido en la naturaleza, se encuentra en el suelo, aire, polvo, pelo de los animales, agua dulce y en sedimentos de agua. La incidencia en productos alimenticios es muy amplia, aunque su frecuencia es mayor en productos como cremas, postres, productos cárnicos y vegetales crudos y cocidos, así como en leche y productos lácteos sometidos a procesos de pasterización (UHT). También, destaca su elevada presencia en el arroz cocido y frito, cereales, las pastas alimenticias y las especias (18, 25).

I. Patogenia y cuadro clínico

La acción patogénica de *Bacillus cereus* está asociada con la producción de dos enterotoxinas diferentes; siendo estas la emética y la diarreica. La enterotoxina emética es un polipéptido de bajo peso molecular (5kDa), estable a procesos térmicos como 126 °C durante 90 minutos; así mismo es resistente a la exposición de pH ácidos como básico (2 a 11) y a la acción de enzimas proteolíticos gástricos e intestinales como tripsina y pepsina. La producción de la enterotoxina en el alimento tiene lugar en el tiempo que media desde el final de la fase exponencial hasta la fase estacionaria de crecimiento de este microorganismo y es posible que esté relacionada con la esporulación (25-29).

La enterotoxina diarreica es un dodecapéptido termolábil de alto peso molecular (40kDa), resiste a calentamientos de 45 °C por 30 minutos y resistencia a

pH ácidos como básicos (4 a 11). Es sensible a enzimas proteolíticas como la tripsina y pepsina (18, 25-29).

1. Síntomas

En la enfermedad diarreica, el período de incubación es de 8 a 16 horas consecutivas, después de haber ingerido el alimento contaminado, se presenta con dolor abdominal, calambres, diarrea acuosa profusa y vómitos; raramente se observa fiebre; además este síndrome es similar a la intoxicación causada por *Clostridium perfringes*. El enfermo se recupera completamente después de 12 a 24 horas. En otros casos como los grupos de riesgo en los que se incluyen ancianos, niños y pacientes inmunodeprimido, la incubación es más corta, ya que oscila de de 1 a 5 horas tras la ingestión del alimento. En estos casos se presentan náuseas, vómitos y malestar general, siendo menos frecuente la aparición de diarrea y dolores abdominales, durando la enfermedad de 6 a 24 horas o más. Los alimentos implicados en todos los casos son carnes, leche, vegetales, pescado y cereales principalmente el arroz (25, 30).

En la enfermedad emética los síntomas aparecen a bajas dosis de contaminantes (1×10^3 Ufc/g). La enterotoxina es el subproducto del metabolismo de las células antes de su consumo. El período de incubación es corto, de 1 a 5 horas tras la ingestión del alimento, presentándose náuseas, vómitos y malestar, siendo menos frecuente la aparición de diarrea y dolores abdominales. La duración de la enfermedad es de 6 a 24 horas. Los síntomas son similares a los que se presentan en la intoxicación causada por *Staphylococcus aureus*. Los alimentos implicados son arroz, productos con almidón, papa, pasta, queso, mezclas de alimento como salsas, budines, sopas, productos para pastelería y ensalada (25-27, 30).

J. Diagnóstico

Para realizar el diagnóstico clínico se procede al cultivo del microorganismo y a realizar pruebas diferenciales entre la forma emética causada por *Bacillus cereus* y la intoxicación por *Staphylococcus aureus*. También debe diferenciarse de los síntomas diarreicos provenientes de una intoxicación provocada por *Clostridium perfringens* (27, 31).

La confirmación de *Bacillus cereus* como el agente etiológico causante del desencadenamiento de una enfermedad transmitida por alimentos requiere el aislamiento de las cepas del mismo serotipo tanto del alimento sospechoso como de las heces o vómitos del paciente y la determinación de su enterotoxigenicidad mediante ensayos serológicos (toxina diarreica) o biológicos (enterotoxina diarreica o emética). El rápido tiempo de inicio de los síntomas de la forma emética de la enfermedad, además de cierta evidencia proveniente de los alimentos involucrados, son a menudo suficientes pruebas para diagnosticar este tipo de envenenamiento alimentario (27, 32).

Además de los datos epidemiológicos (característica de la enfermedad, período de incubación, etc.) y de los resultados de laboratorio, se debe realizar una inspección del local de producción para llegar a una conclusión sobre el agente etiológico (21, 25).

El diagnóstico de *Bacillus cereus* en una intoxicación de alimentos que se lleva a cabo por la confirmación y la cuantificación es como mínimo de 1×10^3 Ufc/g del alimento implicado según la normativa del Codex Alimentarius CX/NEA 03/16 Rev. Dec. 2002 (Anexo 5) (20, 33-35).

K. Epidemiología

1. Epidemiología en Europa

Desde 1950 se describieron los brotes de intoxicación alimenticia en diversos países, en los que se manifestó que *Bacillus cereus* era un agente importante en causas de enfermedades entéricas, siendo los países como Suecia, Noruega y Dinamarca y el resto de Europa que reportan hasta la fecha como el microorganismo de mayor incidencia relativa (3, 26, 42).

Durante la década de los sesenta en Hungría se describieron brotes de intoxicación causada por la ingestión de carne altamente contaminada con esporas de *Bacillus cereus*. Dentro de ello la forma emética fue descrita por primera vez en Inglaterra a partir de 1971 y después en otros países; como en Holanda se han reportado casos de brotes de intoxicación alimenticia a causa del consumo de pastas de fideo elaborado con huevo (siendo de clase específica ("bami")) (3, 29, 26, 43, 51).

2. Epidemiología en Estados Unidos

En Estados Unidos de América, el Centro para Control de Enfermedades de Atlanta (CDC) informó en 1980, nuevos brotes de intoxicación alimenticia causada por *Bacillus cereus* implicando carne de res, pavo y comida mexicana y en 1981, el CDC reportó ocho brotes en el año, siendo el arroz y los mariscos los alimentos implicados. Así mismo en 1982 y 1987, este reportó 16 brotes de ETA's, con un total de 261 casos implicados. Durante este período el estimado de brotes reportados en los Estados Unidos y en el Reino Unido causado por *Bacillus cereus* fue de 1 por ciento a 3 por ciento. En contraste con Canadá y Nueva Zelanda en donde el reporte de intoxicación causada por *Bacillus cereus* fue del 22 por ciento y 7 por ciento respectivamente (26, 36, 42, 43, 51).

En 1993 en Virginia, Colorado, durante el mes de noviembre, en dos distintos centros de cuidados se reportaron 14 personas intoxicadas por *Bacillus cereus* proveniente de arroz frito, preparado el día anterior y almacenado a temperatura ambiente durante toda la noche (37).

En 1998 el departamento de Salud de Texas reportó un brote de intoxicación por *Bacillus cereus* en donde siete personas (6 niños y un adulto) manipularon arroz hidratado de color naranja cuando estaban haciendo un proyecto de artes plásticas y posteriormente consumieron sus alimentos. El microorganismo se encontró en una concentración de 5.6×10^5 Ufc/g. Según los autores este es el primer caso que se reporta donde la intoxicación es por ingestión indirecta (40).

3. Epidemiología en Guatemala

En 1996 catorce países de la región latinoamericana, incluyendo Guatemala notificaron 1,049 brotes de ETA's en los que se enfermaron un total de 35,700 personas, situando una media de 34 enfermos por brote; cifras muy cercanas al año de 1995. De los brotes mencionados, se notificó que en 5 brotes el agente causal fue *Bacillus cereus*. Los brotes informados representan solo una pequeña proporción de los que relativamente ocurren y por este motivo el análisis tiene limitaciones en cuanto a calidad y cantidad de muestras llevadas a cabo (39, 41).

En la Universidad de San Carlos de Guatemala para noviembre del año 2,002, Torón, realizó una investigación de las cafeterías de campus central y del Centro Universitario Metropolitano (CUM). En dicho estudio se evidenció que la cafetería con un mayor recuento de *Bacillus cereus* fue la de la Facultad de Arquitectura (2×10^3 Ufc / g). El recuento reportado en dicha cafetería se encontraba por debajo del límite máximo de acuerdo al parámetro aceptado internacionalmente (6.5×10^5 Ufc/g) y por encima de los valores permitidos (1×10^3 Ufc/g según la normativa del Codex Alimentarius CX/NEA 03/16 Rev. Dec. 2002). El resto de las cafeterías se mantuvieron en un promedio menor a 10 Ufc/g,

mostrándose una prevalencia del 13.3 por ciento de *Bacillus cereus* en las cafeterías de campus central de la Universidad de San Carlos de Guatemala (34).

Por otro lado el crecimiento estudiantil de la Universidad de San Carlos de Guatemala en los últimos años es muy elevado por lo que las ventas de alimentos han aumentado sustancialmente. Debido a esto, en Noviembre del 2003 se aprobó la Normativa de la Actividad Comercial en donde le da liderazgo a Unidad de Salud para mantener la seguridad e inocuidad alimentaria (Anexo 7).

L. Métodos de identificación

Su identificación radica en el análisis de muestras clínicas obtenidas del paciente sospechoso de tener una intoxicación por *Bacillus cereus* para la cual se realiza un recuento aeróbico en placa o en agar manitol yema de huevo polimixina (MYP) y la confirmación se puede hacer por pruebas bioquímicas o solo en agar Mossell (3, 35, 48).

Dentro de las pruebas confirmatorias para la utilización de cultivo MYP se deben observar las siguientes características: (3, 35, 48).

1. En el microscopio debe observarse bacilos largos y gruesos Gram-positivo, con esporas en la que no sobre sale el esporangio (3, 35, 48).
2. Crecen y producen ácido a partir de glucosa en condiciones de anaerobiosis (3, 35 48).
3. En la prueba bioquímica reducen el nitrato a nitrito (algunas son negativas) (3, 35, 48).
4. Producen lecitinasa y no fermentan el manitol en el agar MYP (3, 35, 48).
5. Descomponen la L-tirosina (3, 35, 48).

6. Crecen en presencia de lisozima 0.001 por ciento (3, 35, 48).
7. Producen acetil-metil-carbinol (3, 35, 48).

En los alimentos donde se espera encontrar un valor menor de 10 Ufc/g se recomienda la técnica del número más probable (NMP). Para alimentos deshidratados no es recomendable esta técnica debido al alto contenido de almidón que contienen (3, 35, 48).

M. Medidas de control

El arroz debe hervirse en pequeñas porciones varias veces a lo largo del día reduciéndose de este modo el tiempo de almacenamiento previo a la fritura. Después de hervido el arroz debe conservarse caliente a no menos de 65 ° C o enfriarse rápidamente y llevarse a un frigorífico dentro de las 2 horas siguientes a su cocción. El enfriamiento del arroz, especialmente de grandes cantidades, se acortará dividiéndolo en porciones pequeñas o extendiéndolo en recipientes planos de gran superficie. Se debe enfriar rápidamente en baños de agua o hielo antes de ser refrigerados (49).

El arroz cocido o frito no debe almacenarse en estado tibio y nunca a temperaturas de 15-50° C. Por lo tanto bajo ninguna circunstancia se debe esperar para almacenar más de 2 horas después del cocido a temperatura ambiente, ya que esto promueve el crecimiento bacteriano (49).

Los huevos batidos empleados para preparar arroz frito deben ser recién preparados o utilizar huevo líquido para su cocimiento debido a que por su naturaleza, composición o preparación culinaria presenta la característica de ser excelente caldo de cultivo para la colonización y multiplicación bacteriana y esto hace que se deteriore con suma facilidad (49).

N. Almacenamiento de los alimentos

Comúnmente durante la etapa de almacenamiento los alimentos son mantenidos a una temperatura, que permite el crecimiento de bacterias patógenas; para evitar esto, es necesario conservar los alimentos calientes a una temperatura no menor a los 60 °C. Tan pronto como la temperatura empieza a descender (55 °C) se debe servir el alimento o enfriados para que posteriormente sea refrigerado (34, 50).

1. Enfriado

Un enfriado inadecuado es uno de los factores más frecuentes que contribuyen a los brotes de intoxicaciones alimenticias (34, 50-52).

Los alimentos deben ser enfriados rápidamente en baños de agua o hielo o por otros medios antes de ser refrigerados. En cualquier caso la altura de los alimentos sólidos y semisólidos no debe rebasar el nivel más alto de los bordes del recipiente que los contiene el cual no debe ser muy profundo (se sugieren 10 centímetros como máximo) (34, 50).

La temperatura de la parte central interna del alimento debe disminuir de 60 °C a 21° C en un tiempo no mayor a dos horas. La temperatura varía, por lo tanto es mejor medir la temperatura interna de los alimentos que están siendo enfriados (34, 50).

2. Recalentado

El recalentado es efectuado de manera ineficiente en la mayoría de los establecimientos que requieren utilizar este procedimiento. La temperatura interna de los alimentos a recalentar debe alcanzar mínimo los 72 °C o bien debe trabajarse bajo una combinación letal de tiempo y temperatura. La operación de recalentado es la última etapa donde pueden ser eliminados los riesgos de supervivencia de alguna

bacteria en alimentos cocidos, de ahí la importancia de que el proceso sea eficiente (49, 50-52).

Al recalentar los alimentos empaquetados, es importante verificar que la temperatura de calentamiento sea la de cocción, para eliminar la posible contaminación por mala manipulación al momento de empaquetar (49).

IV. JUSTIFICACION

Anualmente se producen 500,000 casos de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA`s) en el mundo. En su mayoría las ETA`s son diagnosticadas y tratadas a nivel clínico, es decir, sin un adecuado diagnóstico microbiológico. Por lo general el tratamiento que se suministra es únicamente de sostén, el cual consiste en hidratación y reposición de electrolitos pero sin determinar la etiología de la enfermedad. En otros casos también, se da tratamiento con antibióticos y/o antiparasitarios, basando dicho tratamiento solamente en la epidemiología de la región en que ocurre el episodio o brote.

Lo anteriormente expuesto tiene varias consecuencias, entre ellas el sub-registro de agentes etiológicos, el uso innecesario de antibióticos y antiparasitarios que desarrolla resistencia antimicrobiana en la microbiota intestinal. Es preocupante que en Guatemala se sigan manteniendo patrones tradicionales para diagnosticar enfermedades gastrointestinales en donde se piense únicamente en agentes causantes tales como *Shigella sp*, *Salmonella sp*, *Giardia sp* y amebas. Actualmente no se considera el uso de metodologías que podrían diagnosticar otros microorganismos que podrían estar implicados en la patología, como por ejemplo *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*. Con ello, se lograría enriquecer la información epidemiológica de nuestro país así como también el uso adecuado del tratamiento y su prevención.

Con la presente investigación se pretendió brindarle a las autoridades universitarias información con la cual podrán tomar decisiones en la regulación sanitaria para el funcionamiento de estos expendios y aplicar medidas oportunas que permitan llevar un control eficiente en la calidad de los alimentos en los centros regionales y con ello brindarle al estudiante calidad en los alimentos que consume.

V. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar la presencia de *Bacillus cereus* por medio de monitoreo y toma de muestras de arroz cocido preparado por los expendios de las cafeterías de los centros regionales de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

5.2 Específicos

- a. Determinar la presencia de *Bacillus cereus* en el arroz cocido preparado por los expendios de los centros regionales.
- b. Cuantificar la presencia de *Bacillus cereus* en las muestras de arroz cocido preparado por los expendios de los centros regionales.
- c. Identificar las condiciones que contribuyen al crecimiento de *Bacillus cereus* en arroz cocido preparado en las cafeterías de los centros regionales de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

VI. HIPOTESIS

Debido a que la investigación efectuada era de carácter descriptivo, no fue necesario formular hipótesis.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Muestra

30 muestras de arroz cocido que se sirven en las cafeterías de los 10 centros regionales recolectadas en tres muestreos con un intervalo de un mes entre cada muestreo.

B. Recursos

1. Humanos

- a. Tesista: Ingrid Silva Durán
- b. Asesora: Brenda López de Quevedo

2 Institucionales

- a. Sección de control de Microbiología de Alimentos de la Unidad de Salud del Laboratorio Clínico de Bienestar Estudiantil de la Universidad de San Carlos de Guatemala, 3er nivel.

3. Reactivos y Materiales

1. Equipo

- i Incubadora a $30^{\circ} \text{C} \pm 2$.
- ii Baño de María
- iii Autoclave
- iv Cámara de Québec
- v Campana bacteriológica
- vi Quemadores Bunsen
- vii Mezcladores vortex
- viii Licuadora
- ix Aspas
- x Microscópio
- xi Termómetro

xii Congelador, -15 a -20 °C

2. Material

- i Cubreobjetos y portaobjetos.
- ii Botellas de 3 onzas estériles.
- iii Tubos de ensayo de 16 X 125 mm.
- iv Cajas de petri estériles de 15 x 100 mm.
- v Gradillas de metal.
- vi Gradillas de plástico.
- vii Pipetas 1, 5, 10 mL, graduadas 0.1 unidades por mL.
- viii Contador de colonias.
- ix Varillas de vidrio para siembra de 3 a 4 mm de diámetro y extremo de 40 a 50 mm de área.
- x Asas No. 24 de platino o níquel-cromo de 2 mm y 3mm
- xi Marcador permanente
- xii Hielera
- xiii Bata
- xiv Redecillas

2. Reactivos

- i Agua peptonada bufferada
- ii Agar Mossel
- iii Yema de huevo sin telurito
- iv Polimixina B
- v Colorantes para tinciones Gram

4. Cepa Control

- i. *Bacillus cereus* ATCC 14579

D. Metodología

1. Se realizaron tres muestreos sin previo aviso a las cafeterías de los diez centros regionales con un intervalo de un mes entre cada muestreo, obteniéndose un total de treinta muestras de 100 g de arroz cocido. Las muestras se congelaron a -4°C y posteriormente se trasladaron al laboratorio para su respectivo análisis microbiológico. Los resultados se compararon con una cepa control de *Bacillus cereus* ATCC 14579 (55).
2. Determinación y cuantificación de la presencia de *Bacillus cereus*:
 - a. Toma de muestra:
 - i Se recolectó las muestras en bolsas ziploc con un peso de 100g cada uno.
 - ii Etiquetado y cuantificación:

Cada muestra fue acompañada por una copia del reporte de recolección y fue oficialmente sellada con tape, mostrando el número de la muestra, el nombre del analista y la fecha. Cada unidad de muestra tiene un número individual para su respectivo análisis.
 - b. Transporte y almacenamiento de la muestra:
 - i Se transportaron las muestras en hieleras, utilizando baterías congeladas para su transporte a 4°C . Se congelaron las muestras en el freezer -4°C hasta su traslado al laboratorio de alimentos; en un tiempo máximo de 24 horas posterior a la toma de muestra. Se descongeló la muestra entre $2-5^{\circ}\text{C}$ por 18 horas (22, 43).
 - c. Preparación de la muestra:
 - i Se pesó asepticamente 25 g de muestra y se adicionó 225 ml (1:10) de agua peptonada Bufferada. Se homogenizó en

licuadora por 2 minutos a alta velocidad (10000 a 21000 revoluciones por minuto).

- ii Se preparó una serie de diluciones seriadas partiendo de una dilución 1:10 a 1:1000 por una transferencia de 1 ml de la muestra homogenizada en 9 ml de agua peptonada Bufferada, se mezcló bien previó a cada traspaso para mantener homogenización exacta, de la muestra.
- d. Recuento en placa:
- i Se Inoculó con 0.5 ml de cada dilución por duplicado en Agar Mossel.
 - ii Se procedió a esparcir con una varilla de vidrio estéril (2 cajas por muestra) para un total de 1 ml por muestra.
 - iii Se realizaron controles positivos con la cepas ATCC 14579 de *Bacillus cereus*.
- e. Incubación
- i Se Incubaron las placas a 30 °C por 24 - 48 horas.
- f. Identificación:
- i Colonias grandes de color rosado con precipitado alrededor de la misma indicativo de la reacción bioquímica de Lecitina a Lecitinasa, fue confirmatorio para *Bacillus cereus*.
 - ii Se realizó coloración de Gram donde se observaron bacilos Gram positivo, en cadenas de largo variable, con esporas elipsoideas centrales o subterminales.

g. Cálculos:

- i. Para la cuantificación de *Bacillus cereus* se utilizó el método de recuento en placa aplicando los cálculos necesarios para reportar en unidades formadoras de colonia por gramo (Ufc/g) (9).
- ii. Todas las placas con 10 a 100 colonias o más fueron consideradas con presencia de *Bacillus cereus*. Todas las placas con menor de 10 fueron consideradas con ausencia para *Bacillus cereus*.
- iii. El número de células de *Bacillus cereus* por gramo del alimento se calculó en base al número de colonias confirmadas como positivas multiplicadas por la dilución, por el área de la caja y por 0.5 que corresponde a la concentración añadida de la bacteria.

h. Interpretación de resultados:

- i. Se caracterizó por la presencia o ausencia de *Bacillus cereus* en arroz cocido.

Presente: valores de ≥ 100 Ufc/g de *Bacillus cereus* en placas de Mossel

Ausente: valores < 100 Ufc/g de *Bacillus cereus* en placas de Mossel.

- ii. Se tomó en cuenta criterios microbiológicos según la normativa del Codex Alimentarius CX/NEA 03/16 Rev. Dec. 2002, 1×10^3 Ufc/g como mínimo y 1×10^4 Ufc/g como máximo (Anexo 1).

3. Encuesta para determinar probables factores de riesgo:

La encuesta fue dirigida a los manipuladores y dueños de las cafeterías de los centros regionales para determinar las condiciones del manejo del arroz, las cuales son importantes para la posible proliferación de *Bacillus cereus*. Se tomaron las siguientes condiciones (50-52):

a. Duración del tiempo en servirlo:

Menor de 3 horas: Tiempo adecuado para poder servirlo o guardarlo, ya que hay menor probabilidad de crecimiento bacteriano (6-10).

Mayor de 3 horas: Tiempo inadecuado para poder servirlo o guardarlo, ya que hay mayor probabilidad de crecimiento (6-10).

b. Cantidad de arroz:

Menor de 3 libras: Menos predisposición a su mal manejo, debido a un menor volumen (6-10).

Mayor de 3 libras: mayor predisposición a su manejo inadecuado por el volumen ya que permanece más tiempo a temperatura ambiente (6-10).

c. Almacenamiento:

El almacenamiento del arroz cocido sobrante a una temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 1$ (6-10).

Refrigeradora: $5^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Enfriadora: $7^{\circ}\text{C} \pm 1$.

d. Tipo de olla: no debe rebasar el nivel más alto de los bordes del recipiente que los contiene, el cual no debe ser muy profundo (se sugiere 10 cm como máximo) (6-10).

- e. Clima: temperatura ambiente debe ser menor de 35 °C, indicando la literatura que la temperatura optima para su crecimiento es de 35°C a 40°C (6-10).

Clima cálido

Clima templado

Clima frío

E. Diseño de la investigación

1. Tipo de estudio: Descriptivo.
2. Población o universo
Arroz cocido elaborado en cafeterías de diez centros regionales de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
3. Muestra: 3000g de arroz cocido. Se obtuvieron en total treinta muestras de arroz cocido, realizando 3 muestreos en cada cafetería con un intervalo entre muestreos de un mes.
4. Análisis de resultados:

Se utilizó estadística descriptiva para el análisis de los datos. Se compararon las variables a través de la prueba χ^2 y se aplicó la corrección de Yates en los casos necesarios, con un nivel de confianza del 95% y el valor de p se consideró estadísticamente significativo cuando fue menor de 0.05. Se utilizó el programa estadístico EPI-INFO versión 6.04b.

VIII. RESULTADOS

El presente estudio se realizó en las cafeterías de diez centros regionales pertenecientes a la Universidad de San Carlos de Guatemala. Los centros muestreados fueron CUNOC, CUSAM, CUNOROC, CUNSUR, CUNORI, CUDEP, CUNSURORI, CUNOR, CEMA y CUNSUROC. La investigación se dividió en dos partes: en la primera se realizó una encuesta dirigida a los manipuladores de alimentos y dueños de las cafeterías de cada uno de los centros muestreados, para establecer si durante el manejo de arroz en dichos lugares se observaba condiciones favorables para la proliferación de *Bacillus cereus*.

La segunda parte consistió en el muestreo y cuantificación. El muestreo se realizó una vez por mes durante tres meses y se cuantificó *Bacillus cereus* por el método de recuento en placa. Se realizó el control de calidad comparando las características de tamaño, color y reacciones bioquímicas con la cepa de referencia de *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Los resultados obtenidos en las encuestas realizadas en los diez centros regionales se resumen en la tabla No. 1. Se determinó que las personas que manipulan los alimentos fueron en un 100% del género femenino, con un promedio de edad de treinta y cinco años. Dentro de las respuestas obtenidas de los manipuladores de alimentos en los diez centros regionales se determinó que el 20% conoce el correcto almacenamiento del arroz después de su cocción, ya que indicaron haber recibido capacitación en campus central en cuanto a buenas prácticas de manufactura (BPM). El 60% (6 de 10) cocina de 2 a 3 libras de arroz diarias y lo guarda en un plazo óptimo de 1 a 3 horas después de su cocción. El 40% (4 de 10) almacena el arroz en un recipiente adecuado (poco profundo) y refrigera el arroz a una temperatura óptima (4°C).

Tabla 1. Descripción de las condiciones de trabajo en las cafeterías de los 10 centros regionales muestreados (n=10).

Características (n= 10)	Frecuencia de respuesta	Porcentaje (%)
Genero de los manipuladores de las cafeterías estudiadas: Femenino Edad media = 35 años	10	100%
Cantidad de libras de arroz que prepara		
2 a 3 libras	6	60%
4 libras	2	20%
5 libras	2	20%
Días a la semana que se sirve arroz		
1 día	4	40%
2 días	2	20%
3 días	4	40%
Le sobra arroz luego de la producción habitual del día.		
Si	6	60%
Almacenamiento de arroz después de su cocción		
1 a 3 horas	6	60%
Más de 3 horas	4	40%
Recipiente en que se guarda el arroz		
Misma olla	6	60%
Recipiente poco profundo	4	40%
En qué lugar almacena las porciones de arroz diario		
Refrigerador	5	50%
Enfriador	5	50%

Fuente: Resultados obtenidos de la encuesta a manipuladores de los centros regionales/ septiembre – noviembre 2006

En la tabla 2 se muestran los resultados de la cuantificación de *Bacillus cereus* en los 3 muestreos de arroz cocido, recolectados en las cafeterías de los 10 centros regionales. Durante el procesamiento y análisis de laboratorio se obtuvo que el 50% de las muestras (15 de 30) fueron positivas a la presencia de *Bacillus cereus* y presentaron cuantificación mayor o igual a 1×10^3 Ufc/g y el resto presentó valores menores de 100 Ufc/g.

Del 50% (15 de 30) de muestras positivas para *Bacillus cereus*, el 53.3% (8 de 15) obtuvo recuentos de 1×10^5 Ufc/g; el 26.7% (4 de 15) obtuvo recuentos de $1 \times$

10^6 Ufc/g; el 13.3% (2 de 15) obtuvo recuentos de 1×10^4 Ufc/g; y el 6.7% (1 de 15) obtuvo un recuento de 1×10^3 Ufc/g.

En relación a la presencia de *Bacillus cereus* se observa que en el CUNOC y en el CEMA se obtuvo una muestra positiva (1 de 3 muestreos), en el CUNSUR y CUNSORORI se obtuvo dos muestras positivas (2 de 3 muestreos), en el CUDEP, CUNORI y CUNOR se obtuvo tres muestras positivas (3 de 3 muestreos) a la presencia de *Bacillus cereus*.

Tabla 2: Cuantificaciones de *Bacillus cereus* en muestras mensuales de arroz cocido en diez centros regionales de la USAC (n=30)

CENTRO REGIONAL	Muestreo 1 Septiembre n=10	Muestreo 2 Octubre n=10	Muestreo 3 Noviembre N=10
	UFC/g	UFC/g	UFC/g
Quetzaltenango (CUNOC)	<100	1×10^4	<100
San Marcos (CUSAM)	<100	<100	<100
Huehuetenango (CUNOROC)	<100	<100	<100
Escuintla (CUNSUR)	<100	1×10^6	1×10^5
Chiquimula (CUNORI)	1×10^5	1×10^4	1×10^5
Petén (CUDEP)	1×10^6	1×10^5	1×10^5
Jalapa (CUNSORORI)	1×10^5	1×10^6	<100
Cobán (CUNOR)	1×10^6	1×10^5	1×10^5
Guatemala (CEMA)	<100	1×10^3	<100
Mazatenango (CUNSUROC)	<100	<100	<100

Fuente: datos experimentales obtenidos en laboratorio de control de alimentos de Unidad de Salud/BEU/ 2006

*UFC/g= Unidades Formadoras de Colonia por gramo de alimento

*Menor de 100= No se encontró la presencia de *B. cereus* en la dilución más pequeña.

En la tabla 3, se observan los datos analizados por el método estadístico de Chi^2 con corrección de Yates, la cual se realizó debido a que la encuesta consistió en un cuestionario de preguntas cerradas con opciones múltiples para los datos cualitativos.

El análisis estadístico determinó que las condiciones favorables que tuvieron asociación significativa con la proliferación de *Bacillus cereus* en las muestras de arroz fueron: la cantidad de libras que se prepara ($P=0.0006$); frecuencia con la que se sirve ($P=0.0044$); almacenamiento de arroz después de su cocción ($P=0.007$) y el lugar donde se almacena las porciones de arroz diario ($P=0.046$).

Tabla 3: Condiciones de trabajo y cuantificación de *Bacillus cereus* en los 10 centros regionales muestreados (n=30), según límite de confianza.

Condiciones	Presencia $\geq 1 \times 10^3$ Ufc/g 15 (50%)	Ausencia < 100 Ufc/g 15(50%)	P
Cantidad de libras que prepara			
2 libras	2	13	0.0006
3 libras	2	1	
Más de 4 libra	11	1	
Frecuencia con la que sirve arroz			
1 día	3	9	0.0044
2 días	4	2	
3 días	8	4	
Sobra arroz luego de la producción habitual			
Si	11	7	0.26
No	4	8	
Tiempo de almacenamiento de arroz después de su cocción			
1 a 3 horas	4	14	0.007
Más de 3 horas	11	1	
Recipiente en que se guarda el arroz			
Misma olla	8	7	1.0
Recipiente poco profundo	7	8	
Donde almacena las porciones de arroz diario			
Refrigerador	9	6	0.046
Enfriador	6	9	

Fuente: datos experimentales obtenidos en laboratorio de Control de alimentos de Unidad de Salud/BEU/ 2006
 *p= Probabilidad que el evento sea significativo.

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Bacillus cereus está muy difundido en la naturaleza, se encuentra en el suelo, aire, polvo, pelo de los animales, agua dulce y en sedimentos de agua. La incidencia en los productos alimenticios es muy amplia, pero se destaca su elevada presencia en el arroz cocido y frito, cereales, pastas alimenticias y condimentos (25).

Con el fin de determinar y cuantificar la presencia de *Bacillus cereus* en arroz cocido se realizó este estudio en las cafeterías de los diez centros regionales de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El estudio consistió en realizar tres muestreos a cada cafetería de los diferentes centros, recolectándose y analizando un total de treinta muestras para la cuantificación de dicha bacteria.

Los resultados obtenidos a partir de los análisis microbiológicos (tabla 2) mostraron que 15 de 30 (50%) muestras analizadas fueron positivas a la presencia de *Bacillus cereus*. Según la normativa del *Codex alimentarius*, el criterio microbiológico de aceptación para *Bacillus cereus* en cereales que incluye arroz está entre 1×10^3 Ufc/g y 1×10^4 Ufc/g, y se ha reportado que *Bacillus cereus* en mayores concentraciones produce toxi-infecciones. En este estudio se demostró que en 12 de 15 (80 %) muestras positivas pertenecientes al los centros regionales CUNSUR, CUNSURORI, CUNORI, CUNOR Y CUDEP se supera el límite máximo establecido por *Codex*, lo que pudo desencadenar una intoxicación alimentaria por *Bacillus cereus* en la población estudiantil de los centros regionales que consumió el arroz.

El análisis estadístico que se realizó para evaluar la asociación entre diversas condiciones de riesgo y proliferación detectada de *Bacillus cereus* en las cafeterías de los centros regionales estableció que el tiempo de almacenaje inadecuado del arroz después de su cocción, la no utilización de equipo adecuado de almacenamiento, la cantidad de arroz y la frecuencia con que se prepara, representaron condiciones favorables para la proliferación de *Bacillus cereus* en este estudio. La FAO/OMS indica que entre los factores más importantes

relacionados con la aparición de brotes de intoxicaciones alimentarias por *Bacillus cereus* se encuentran las condiciones mencionadas anteriormente (32).

Además se puede observar en tabla 2 que en el segundo muestreo el 70% (7 de 10) de los centros regionales obtuvo presencia de *Bacillus cereus*, esto podría explicarse por el hecho de que el personal era de nuevo ingreso y ellos indicaron no saber cuál era la forma correcta de almacenar el arroz después de su cocción.

En 2002, Torón realizó una investigación en el Campus Central y Centro Universitario Metropolitano (CUM), determinando la presencia y recuentos no significativos de *Bacillus cereus* (34); sin embargo el presente estudio es el primero en demostrar la presencia de *Bacillus cereus* en niveles por encima de lo establecido por *Codex Alimentarius* en Guatemala, por lo que es necesario la implementación de programas de análisis de riesgo, puntos críticos de control, capacitación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y regulaciones sanitarias como un esfuerzo para minimizar el riesgo de sufrir intoxicaciones por *Bacillus cereus* en la población estudiantil (32).

X. CONCLUSIONES

1. El 50% (15 de 30) de las muestras de arroz evaluadas en las cafeterías de los diez centro regionales, fueron positivas para la presencia de *Bacillus cereus*.
2. En el 80% (12 de 15) de las muestras positivas pertenecientes a los centros regionales de CUNSUR, CUNORI, CUDEP, CUNSORORI Y CUNOR se obtuvo recuentos superiores a los criterios microbiológicos aceptables según la normativa *Codex Alimentarius*.
3. Las condiciones que contribuyen al crecimiento de *Bacillus cereus* en arroz cocido, preparado en las cafeterías de los centros regionales son: el almacenaje inadecuado de arroz después de su cocción, el tiempo de almacenaje, la no utilización de equipo adecuado de almacenamiento, la cantidad de arroz y la frecuencia con la que se prepara.
4. La evaluación microbiológica del arroz cocido en las cafeterías de los diez centros regionales de la Universidad de San Carlos de Guatemala permitió establecer que este alimento si representó un riesgo potencial para la población consumidora.

XI. RECOMENDACIONES

1. Es necesario continuar estudios similares a la presente investigación, en una población más grande, con el fin de determinar y poder hacer inferencias sobre la presencia de *Bacillus cereus* a nivel nacional.
2. Implementar talleres de capacitación de buenas prácticas de manufactura para el adecuado almacenamiento y preparación de arroz cocido en las cafeterías de los diez centros regionales de la USAC.
3. El Laboratorio de Control Microbiológico de Alimentos de la Unidad de Salud debe establecer análisis de rutina y monitoreo para identificar y cuantificar *Bacillus cereus* en arroz preparado en las cafeterías de los centros regionales.
4. Hacer cumplir el Reglamento de Actividad Comercial por parte de la Dirección General de Administración (DIGA) en los muestreos de alimentos en los diez centros regionales por lo menos una vez al mes.

XII. BIBLIOGRAFIA

1. OPS/OMS. Enfermedades causadas por alimentos. Febrero 2006 Disponible en: www.panalimentos.org/panalimentos/educacion/education.aspx?id=67. 2006. 38p. (p. 1-38).
2. Food and Drug Administration (FDA). Bacteriological Analytical Manual (BAM). 8ed. Chapter AOAC International. Arlington, VA. 1995. 300p. (p. 184-198).
3. Mossel, D. Microbiología de los alimentos. Zaragoza España: Editorial Ascribia S.A., 1998. 284p. (p. 21-28,30)
4. Norman, P. Ciencia de los alimentos. 5ª. ed. España: Editorial Ascriba S.A., 1999. 225p. (p. 131-139).
5. Potter N., Hotchkiss J. Ciencia de los alimentos. Zaragoza, España: Editorial ACRIBIA S.A. 1995. 300p (p. 55-56, 115-118)
6. Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos. Numeración e identificación de microorganismos causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Guatemala. Doc. Tec. 2003.
7. Diario de la Seguridad Alimentaria. Enfermedades Transmitidas por los Alimentos, Doc. Tec. Disponible en: www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad/consumo/2003/08/19/7902.php. 2006. 119p. (p. 18-34). Febrero 2006.
8. Nomdedeu, C. *et al.* Manual para Manipuladores de Alimentos Genéricos. Madrid: Cecoma, 2002. 86p. (p. 12-22, 34-56).
9. FAO/OMS. Codex Alimentarius. Requisitos generales (Higiene de los Alimentos) suplemento al volumen 1, 2.ed. 1993. (p. 234).

10. Ministerio de Sanidad y Consumo. Guía práctica de Higiene Alimentaria. Guatemala: editorial PROMED S.A., 1989. 45p. (p. 11, 16-17, 29 y 37).
11. Comisión del Codex Alimentarius, Doc. Tec. Disponible en: www.foa.org/WAICENT/OIS/PRESS_NE/PRESSSPA/2001/prsp0143.htm 2006. 5p. (p. 1-5). Mayo 2006.
12. INPPAZ OPS/OMS. Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos Doc. Tec. Disponible en www.intranet.inpaz.org.ar/nhp/v/ehome.aso 2001. 56p. (p. 4-25). Mayo 2006.
13. Logan, N. and Turnbull, P. Bacillus and Recently Derived Genera. Manual of Clinical Microbiology. 7th. ed. Washington D.C: American Society for Microbiology, 2002. 702p. (p. 232-242).
14. FAO/OMS. Codex Alimentarius. Requisitos generales (Higiene de los Alimentos) suplemento al Vol. 1B 1998. 254p. (p. 56-61).
15. Hobbs B. Higiene y Toxicología de los Alimentos. U.S.A.: Editorial Acribia, S.A., 1986. 196p. (p. 108).
16. Koneman, W. E. Color Atlas and Text Book of Diagnostics Microbiology. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. 1200p. (p. 655-664).
17. Spinoza, MR. *et al.* On the Fate of Ingested Bacillus Spores. Res. Microbiology, 2000. 151: (p. 351-368).
18. Adams, MR y Moss, MO. Microbiología de los Alimentos. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A., 1995. 464p. (p. 201-204).
19. Buchanan, RE. & Gibbins, NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th.ed. Baltimore: The William and Wilkins Company, 1997. 657p. (p. 529-535).

20. Marvin LS. Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods, 2. ed. New York: American Public Health Association 1986. 702p. (p. 417-423).
21. Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infection. *Microbes Infect* 2000; 2(2): (p. 189-199).
22. Frazier W.C., Westhoff, D. Food Microbiology. 3 ed. New York: McGraw-Hill Inc. 1998. 540p. (p. 419-424, 446-447).
23. Ganesan, AT. & Hoch, JA. Genetics and Biotechnology of Bacilli. Orlando: Academic Press Inc., 1984. 205p. (p. 129-140).
24. Doi, R.H. & McGloughlin, M. Biology of Bacilli, Applications to Industry. Boston: Butterworth-Heinemann, 1992. 565p. (p.1-22, 251-311).
25. Anderson A, Granum PE, Ronner U. The adhesion of *Bacillus cerueus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *JFoods Microbiologic* 1998; 39 (1-2): (p. 93-94).
26. Agata N, Otha M, Mori M. Production of emetic toxin is associated with specific class of *Bacillus cereus*: *Curr Microbial* 1996; 33 (1): (p. 67-69).
27. Minnaard J. Humen, Pérez PF. Effects of *Bacillus cereus* exocellular factors on human intestinal epithelial cell. *J Food Prot* 2001; 64 (10): (p. 1535-1541).
28. Finlay, WJ., Logan, NA., and Sutherland, AD. *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures: *Lett Appl Microbial*.2000; 31(5): (p. 384-394).
29. Ombui, JN. et al. *Bacillus cereus* may Produce Two or More Diarrheal Enterotoxins. *FEMS Microbiology Letters*. 1997; 149: (p. 245-248).

30. Kramer, JM. and Gilbert, JM. Ed. *Bacillus cereus* and other Bacillus species, 345-367. Food borne Bacterial Pathogen, M.P. Doyle. New York: Marcel Dekker, Inc, 1989. (p. 1059).
31. Pouch F. and Ito K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. Washington D.C: American Public Health Association. 2001. 675p. (p. 13-37).
32. FAO/OMS. Codex Alimentarius Requisitos Generales, Higiene de los Alimentos. Vol. 1B 2.ed. 1995. 189p. (p. 79-80).
33. Bennett, RW., and Harmond, SM. *Bacillus cereus* Food Poisoning In Laboratory Diagnosis of Infectious Disease. New York: Springer-Verlag. Vol. I, 1998. 137p. (p. 83-93).
34. Torón, L. Identificación y Cuantificación de *Bacillus cereus* en arroz preparado y distribuido en las cafeterías del Campus Central y Centro Universitario Metropolitano (CUM) de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.) 2002. 34p. (p. 2-34).
35. Jeffery R. and Stanley M. *et al. Bacillus cereus*. In: Bacteriological Analytical Manual *Online*. 8th ed. U.S.A: Food and Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition, Doc. Tec. Disponible en: www.cfsan.fda.gov/ebam-14htm 2006. 167p. (p. 45-62). Marzo 2006.
36. Bean N., and Griffin P. Food borne disease outbreaks in the United States, 1973-1987. Pathogen, vehicles and trends. *J. Food Project*. 1990; 53: (p. 804-817).
37. Bandhaya MS. Food poisoning and other clinical diseases caused by *Bacillus cereus*. *J Med Assoc Thai*. 1985; 68(8): (p. 45-48).

38. Schneider, S. Situaciones de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos en Guatemala. Guatemala: FAO, Doc. Tec. Proyecto TCP/RLA/0065 2005. 40p. (p. 1-40).
39. Pena P, *et al.* Epidemic outbreak in a home for the aged caused probably by *Bacillus cereus*. *Aten Primaries* 1998;22(10): (p. 649-654).
40. Marvin, L.S. compendium of Methods for the Microbiological Examination of food. 2 ed. New York: American Public Health Association. 1986 702 p. (p. 278-279).
41. OPS. Brotes y casos de ETA notificados en 1996 en 14 países. México: sistema de Información para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos. 1996. 28p. (p. 1-28).
42. Miranda, T. Informe de avance; Programa de Control Sanitario en Mercados, Restaurantes, Cafeterias y comedores en la Ciudad de Guatemala. Guatemala : LUCAM, Doc. Tec. 1994 (p. 1-19).
43. Sagastume M. Situaciones Epidemiológicas de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos y Agua en 1997-2001. Guatemala: VIGEPI. Doc. Tec. 2002. 35p. (p. 21-24).
44. Jawetz, M. Microbiología. 4 ed. México: Editorial el Manual Moderno. S.A. 1995. 807p. (p. 254-264).
45. Hardwood, CR. Bacillus. New York: Plenum Press, 1989. 23p. (p. 2-23).
46. Parks, LC. Handbook of Microbiological Media. 2. ed. CRC Press Inc., 1997. 1145p. (p. 54-67).
47. Harmon, SM. New Method of Differentiating Members of the *Bacillus cereus*. Group: Collaborative Study J. Assoc. off. Anal. Chem. 1982; 65: (p. 1134 - 1139).

48. A & A TecnoLab S.A. Instructivo de Análisis y Determinación de *Bacillus cereus*. Laboratorio de Microbiología. Doc. Tec. Disponible en: www.verterinaria.unex.es/micalim/Bcereus.htm. 1998. 250p. (p. 1-250). Marzo 2006.
49. Lambiri M, Mavridou A, Papadakis JA. The application of hazard analysis critical control points (HACCP) in a flight catering establishment improved the bacteriological quality of meals. *JR Soc Health* 1995; 115(1): (p. 26-30).
50. McElroy DM, Jaykus LA, Foegeding PM. Validation and analysis of modeled predictions of growth of *Bacillus cereus* spores in boiled rice. *J Food Prot* 2000; 63(2): (p. 268-272).
51. Evans MR, Riley CL, Ribeiro CD. Fried rice from the take-away. *CDR (London)*. 1974; 73(3): (p. 433-444).
52. Holbrook, R. and Anderson, JM. An Improved Selective And Diagnostic Medium for the Isolation and Enumeration of *Bacillus cereus* in Food: *Can. J. Microbial*. 1980; 26: (p. 753-759).
53. Gilbert, RJ. Stringer, MF. and Pearce, JM. The survival and growth of *Bacillus cereus* in boil and fried Rice in relation of outbreaks of food poisoning: *J Hyg* 1974; 73 (3): (p. 433-444).
54. Lancette, GA. and SM. Enumeration and Confirmation of *Bacillus cereus* in Food: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1980; 63: (p. 581-586).
55. Parry JM, Gilbert RJ. Studies on the heat resistance of *Bacillus cereus* spores and growth of the organism in boil rice: *J Hyg (London)* 1980; 84(1): (p. 77-82).
56. Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos. Microorganismos de los alimentos; Métodos de muestreo para

- análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas. 2 .ed. España: Editorial Acribia, S.A., 1999. 354p. (p. 184-250).
57. Comunicación personal con Lic. Jorge Luis De León, Jefe del Departamento de Biometría e Informática: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
 58. INSIVUMEH. Datos Meteorológicos de las Cabeceras Departamentales. 2 e.d. Guatemala: Sección de climatología, 1995. (p. 17-184).
 59. INCAP. Curso Inocuidad Alimentaria. Guatemala: Doc. Tec. 2002. 31p (p. 1-31).
 60. OPS, OMS. Vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA'S) en Latinoamérica y el Caribe. USA: Doc. Tec. 1999. 5p. (p. 1-5).
 61. Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en salud. Factores de riesgo en el consumo de alimentos en la ciudad universitaria. Guatemala: Universidad de san Carlos, Doc. Tec. 1991. 9p. (p. 1-9).
 62. DIGI. DIAJ Proyecto final del reglamento para la actividad comercial dentro de las instalaciones y ambientes de la USAC, Guatemala: Universidad de San Carlos, Doc. Tec. 1991. 5p. (p. 1-5).
 63. Acta Número 28-2003. Consejo Superior Universitario. Noviembre 2003. 20p. (p. 1-20).
 64. Schult F.J. y Smith J.L. Bacillus: Recent Advance In Bacillus cereus. Food Poisoning Reserch. Y.H. Hui, J. R. Gorham, K.D. Murrell, D.O. Cliver (Ed), Food Disease Handbook Disease Caused by Bacteria, vol1, (p. 29-62), Marcl Dekker, Inc. New York, 2004.

XIII. ANEXO

Anexo 1: Normativa del Codex Alimentarius para Alimentos

codex alimentarius commission					
		FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS		WORLD HEALTH ORGANIZATION 	
<small>JOINT OFFICE: Viale delle Terme di Caracalla 00100 ROME Tel: 39 06 57051 www.codexalimentarius.net Email: codex@fao.org Facsimile: 39 06 5705 4593</small>					
Agenda Item 13			CX/NEA 03/16 December 2002		
JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME					
CODEX COORDINATING COMMITTEE FOR THE NEAR EAST					
Cereales y productos a base de cereales					
Producto	Microorganismos	Limite Por ml o gramo			
		n	c	m	M
Cereales (enteros)	Mohos	5	2	10 ²	10 ⁴
Cereales como harina, bran	<i>Bacillus cereus</i>	5	1	10 ³	10 ⁴
	<i>Clostridium perfringens</i>	5	1	10 ²	10 ³
Harina de soya, concentrados	Mohos	5	2	10 ²	10 ⁴
	Salmonella	5	0	0	-
	<i>Escherichia coli</i>	5	0	0	-
	<i>Bacillus cereus</i>	5	0	10 ²	-
Pasteles y productos horneados (preparados) cubiertas	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	1	10	10 ²
	Salmonella	20	0	0	-
	<i>Escherichia coli</i>	5	0	10	-
	<i>Bacillus cereus</i>	5	0	10	-
Pizza, masa congelada para pies de carne con relleno o entradas que contengan harina de arroz como ingrediente primario	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	1	10 ²	10 ⁴
	Salmonella	10	0	0	-
	<i>Bacillus cereus</i>	5	1	10 ³	10 ⁴
Cereal en hojuelas o inchadas, productos de patatas, secos y presionados	Aerobios conteo en placa	5	1	5x10 ⁴	10 ³
	<i>Bacillus cereus</i>	5	1	10 ³	10 ⁴
	Salmonella	5	0	0	0
	<i>Clostridium perfringens</i>	5	0	0	0
	<i>Escherichia coli</i>	5	0	0	0
Mezclas de pastels secos con alto contenido de huevo	Coliformes	5	1	50	10 ³
	Mohos y levadura	5	1	2x10 ²	10 ³

Panes especiales, dulce con huevo o leche	Coliformes	5	1	50	10^3
	Mohos y levaduras	5	1	10^2	2×10^3
	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	1	10	10^3
	Salmonella	10	0	0	0
Macaron/pasta, secos, con o sin relleno	Clostridia reductora de sulfito	5	2	20	10^4
	Coliformes	5	2	10	10^4
	Mohos y levaduras	5	2	10^2	10^4
	Salmonella	10	0	0	0
	<i>Escherichia coli</i>	5	0	0	0
Almidon	Aerobios conteo en placa	5	2	10^2	10^3
	Mohos y levaduras	5	2	10^2	10^3
	<i>Staphylococcus aureus</i>	5	2	10	10^2
	Salmonella	5	0	0	-

Fuente: Normativa *Codex alimentarius*, Diciembre 2002.

anexos 2: Encuesta para manipuladores de alimentos en los centros regionales.

UNIVERSIDAD E SAN CARLOS DE GUATEMALA
BIENESTAR ESTUDIANTIL UNIVERSITARIO
UNIDAD DE SALUD

Edad: _____ Sexo: ____F ____M

1. ¿Sabe usted cuál es el efecto de no guardar adecuadamente el arroz cocido?

____Si ____No

2. ¿Prepara usted arroz todos los días en su establecimiento?

____Si ____NO

3. ¿Si contesto sí, cuántas libras prepara al día arroz en su cafetería?

_____Libras

4. ¿Si contesto no, cuántos días a la semana sirven arroz en su cafetería?

_____Días

5. ¿Le sobra a usted arroz cocido luego de La producción habitual del día?

____Si ____No

6. ¿Cuánto tiempo después de cocinar El arroz, lo guarda usted?

____ 1 a 3 horas ____Más de 3 horas

7. ¿En que recipiente guarda usted El arroz sobrante?

____Misma olla ____Recipiente poco profundo

8. ¿En que lugar almacena las porciones de arroz diario?

____Refrigerador ____Enfriador