

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



IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *BACILLUS CEREUS* EN ARROZ FRITO
PREPARADO PARA CONSUMO EN RESTAURANTES DE COMIDA CHINA DE LA
ZONA 1 DE LA CIUDAD CAPITAL DE GUATEMALA

ALEIDA ELIZABETH MUÑOZ VÁSQUEZ

MELANIE DESSÍRE ALONZO CUYÁN

SILVIA EUGENIA PEREIRA NORIEGA

QUÍMICAS BIÓLOGAS

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2016

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

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a saint in a red robe, surrounded by various symbols including a crown, a lion, and a cross. The Latin motto "CETERAS ORBIT CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMAL ENSIS INTER" is inscribed around the perimeter. Two columns with banners reading "PLUS" and "ULTRA" are also present.

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *BACILLUS CEREUS* EN ARROZ FRITO
PREPARADO PARA CONSUMO EN RESTAURANTES DE COMIDA CHINA DE LA
ZONA 1 DE LA CIUDAD CAPITAL DE GUATEMALA

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN
PRESENTADO POR

ALEIDA ELIZABETH MUÑOZ VÁSQUEZ

MELANIE DESSÍRE ALONZO CUYÁN

SILVIA EUGENIA PEREIRA NORIEGA

PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICAS BIÓLOGAS

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2016

ÍNDICE

	Contenido	Páginas
I.	Resumen	1
II.	Introducción	3
III.	Antecedentes	5
	A. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS)	5
	B. Características generales de <i>B. cereus</i>	6
	C. Fuentes de <i>B. cereus</i>	7
	D. Características de crecimiento y sobrevivencia de <i>B. cereus</i>	7
	E. Factores implicados en la proliferación de <i>B. cereus</i>	8
	F. Recomendaciones especiales para prevenir la proliferación de <i>B. cereus</i>	9
	G. Formación de la spora de <i>B. cereus</i>	9
	H. Comportamiento de las esporas de <i>Bacillus cereus</i> en el arroz	10
	I. Toxinas producidas por <i>B. cereus</i>	11
	1. Toxina Emética	12
	2. Toxina Diarreica	13
	J. Producción de toxinas por otras especies de <i>Bacillus</i> sp	14
	K. Brotes de <i>B. cereus</i>	15
	1. Brotes en Guatemala de <i>B. cereus</i>	16
	L. Efectos adversos en la salud de <i>B. cereus</i>	16
	M. Intoxicación por <i>B. cereus</i>	17
	1. Mortalidad de <i>B. cereus</i>	18
	2. Dosis respuesta de <i>B. cereus</i>	18
	N. Alimentos asociados a <i>B. cereus</i>	19
	1. El arroz	19
	O. Métodos microbiológicos de identificación de <i>B. cereus</i> en alimentos	20
	1. Método de recuento en placa en superficie de <i>B. cereus</i>	20
	2. Técnica del Numero Más Probable y el Método de Investigación de <i>B. cereus</i>	21
IV.	Justificación	22

	Contenido	Páginas
V.	Objetivos	24
VI.	Hipótesis	25
VII.	Materiales y Métodos	26
VIII.	Resultados	36
IX.	Discusión de Resultados	39
X.	Conclusiones	43
XI.	Recomendaciones	44
XII.	Referencias Bibliográficas	45
XIII.	Anexos	50

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M. A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

AGRADECIMIENTOS

A Dios: Por darnos, una familia, las bendiciones recibidas, la fortaleza, la perseverancia y la inteligencia en todo el camino recorrido hasta llegar a alcanzar esta meta.

A nuestros padres: Por sus esfuerzos, sacrificios, consejos, ayuda y su apoyo incondicional en cada momento de tristeza, alegría y lucha que vivimos en este camino, para alcanzar nuestros sueños.

A nuestra familia: Por su presencia, apoyo y por ser parte de nuestra vida y compartir muchas alegrías.

A nuestros amigos: Por su amistad sincera

A los catedráticos de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia: Por todas las enseñanzas y conocimientos aprendidos a lo largo de nuestra carrera, que fueron sembrados y darán sus frutos en nuestra carrera profesional.

A nuestro asesor Lic. Martín Gil: por sus conocimientos y correcciones brindadas en la elaboración de nuestra investigación.

A nuestras revisoras:

Dra. Karin Herrera y Licda. Isabel Gaitán: Por sus conocimientos para enriquecer nuestra investigación.

Licda. Alba Marina Váldez de García: Por sus valiosos conocimientos para enriquecer nuestro trabajo de investigación.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala: Por albergarnos en sus aulas y por permitirnos ser parte de la tricentenaria Universidad de San Carlos de Guatemala.

Licda. Ana Rodas: Por su apoyo para poder realizar nuestro trabajo experimental en las instalaciones del Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos (LAFYM)

I. RESUMEN

Bacillus cereus es una bacteria esporoformadora de amplia distribución en la naturaleza y está asociada a diversos tipos de alimentos, como productos lácteos, arroz hervido, arroz frito, pasta, carne, pollo, etc. Debido a que es una bacteria esporoformadora puede sobrevivir y permanecer en el alimento, produciendo toxinas que conlleven a intoxicaciones alimentarias al consumir alimentos que no son preparados y almacenados en condiciones adecuadas.

La presente investigación se llevó a cabo en nueve restaurantes de comida china de la zona 1 de la ciudad capital, avalados por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, con el propósito de identificar y cuantificar la presencia de *B. cereus* en arroz frito de pollo, lomito y mixto, que es preparado en los restaurantes mencionados. El trabajo consistió en tres muestreos seriados, con un intervalo de 15 días entre cada uno, recolectándose un total de 81 muestras. El análisis microbiológico de las muestras se realizó en el Laboratorio de Análisis Fisicoquímicos y Microbiológicos.

Los resultados obtenidos establecieron que el 8.64 % de las muestras analizadas fueron positivas a la presencia de *B. cereus*. De estas muestras, el recuento obtenido del microorganismo fue superior a 6.0×10^4 UFC/g, lo que supera el límite permitido por el *Codex alimentarius* para *B. cereus* en cereales como el arroz, siendo no aptas para consumo humano. Se considera que este resultado demuestra que el consumo de este alimento es un riesgo para la salud del consumidor y podrían desarrollarse en el alimento la toxina emética y/o diarreica lo que llevaría a una intoxicación alimentaria con serias implicaciones.

En la mayoría de muestras analizadas se obtuvo un recuento constante menor a 10 UFC/g, indicativo de ausencia de *B. cereus*. Del total de muestras en estudio se determinó que en el 91.36 % de las muestras (74 de 81), no se obtuvo crecimiento del microorganismo en estudio. Estas muestras fueron consideradas como aptas para el

consumo humano. Estos resultados indican que la mayoría de restaurantes preparan el alimento en condiciones adecuadas es decir, producen un alimento inocuo.

II. INTRODUCCIÓN

Se considera a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), como una importante causa de enfermedad en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que en países menos desarrollados como Guatemala, las ETA son causa de enfermedades gastrointestinales, asociadas a una carga socio-económica significativa. Los cambios en los hábitos alimentarios de la sociedad, como el consumo de alimentos preparados, comidas fuera del hogar y comidas rápidas, son factores que contribuyeron al incremento de las ETA (Olea y Díaz, 2012).

La OMS estima que en el mundo, la incidencia anual de diarreas es de 1.500 millones de casos y 3 millones de niños abajo de 5 años de edad mueren anualmente. Los registros epidemiológicos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Guatemala, se limitan principalmente a la incidencia de las diarreas sin detallar el agente etiológico y el alimento implicado en la transmisión de la enfermedad (Blanco, 2009). En Guatemala, el impacto económico de las enfermedades transmitidas por los alimentos es importante porque afecta actividades económicas, como el turismo y la exportación de frutas, además de contribuir a la desnutrición crónica de la población. Las enfermedades transmitidas por alimentos están presentes entre las diez primeras causas de muerte, incluyendo las enfermedades diarreicas agudas en el cuarto lugar (Schneider, 2005).

El Ministerio de Salud Pública ha realizado estudios anteriormente en la población, en los que se han identificado a los agentes relacionados con los brotes de diarrea, encontrando que aproximadamente el 70% de las diarreas son originadas por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos o toxinas, como las exotoxinas de *Bacillus cereus*. La incidencia de *B. cereus* en arroz es alta, y este alimento se asocia con mucha frecuencia a brotes de intoxicación. La amplia distribución del microorganismo, permite que sobreviva en alimentos listos para consumo, especialmente en alimentos que contienen cereales, entre ellos el arroz. El hecho de que esta bacteria tenga la habilidad de sobrevivir en diferentes ambientes y en condiciones de estrés, hace muy difícil para la industria excluir a *B. cereus* de los alimentos como el arroz (Schneider, 2005).

Por consiguiente, el presente estudio tuvo como finalidad la identificación y cuantificación de *B. cereus*, para ello se demostró la viabilidad de éste a las temperaturas de cocción en arroz preparado listo para consumo en restaurantes de comida china de la zona 1 de la ciudad Capital de Guatemala.

III. ANTECEDENTES

A. Enfermedades transmitidas por alimentos

“El alimento es toda sustancia procesada, semiprocada o no procesada, que se destina a la ingesta humana incluidas las bebidas, goma de mascar y cualquiera otra sustancia que se utilice en la elaboración, preparación y tratamiento del mismo, pero no incluye los cosméticos, el tabaco ni las sustancias que se utilizan como medicamentos; el alimento contaminado es aquel que contenga cualquier agente biológico o químico, materia extraña u otras sustancias no añadidas intencionalmente y que pueden comprometer la inocuidad o la aptitud de los alimentos tomados” (RTCA, 2008).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se refieren a cualquier enfermedad causada por la ingestión de un alimento contaminado que provoca efectos nocivos en la salud del consumidor. En los países desarrollados, las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), son responsables de altos niveles de pérdida de productividad, aumento de costos asociados al uso de los servicios de salud y a la implementación y monitoreo de políticas de inocuidad de los alimentos. Aproximadamente el 70% de las diarreas se originan por la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos o toxinas. Se han descrito alrededor de 250 agentes causantes de ETA, entre los que se incluyen bacterias, virus, hongos, parásitos, priones, toxinas y metales. Los cambios en los hábitos alimentarios de la sociedad, como el consumo de alimentos envasados, comidas fuera del hogar, expendio de comidas preparadas y comidas rápidas, son factores que contribuyeron al incremento de las ETA. Estos cambios en los estilos de vida revisten riesgos, fundamentalmente en las sociedades desarrolladas. En comunidades con menor nivel socio-económico, continúa la prevalencia de las enfermedades entéricas como el cólera, la fiebre tifoidea y los parásitos. La posible relación entre factores socio-demográficos como el envejecimiento de la población, también podría estar influyendo en la aparición de estas enfermedades (Olea y Díaz, 2012).

B. cereus se encuentra en el suelo, el polvo y las plantas. Su presencia es frecuente en las patatas y en otras hortalizas, y desde estas contamina diversos alimentos. *B. cereus* se encuentra también en grandes cantidades en los embutidos, la leche y el huevo en polvo,

por lo que se convierte en un contaminante frecuente de la harina (almidón) de cereales y de la fécula de patata, ingredientes ambos de los polvos utilizados para preparar cremas de vainilla (flanes). Las cremas de vainilla y otros alimentos análogos han sido causa de varias enfermedades por haber sido preparados con un día de antelación y mantenidos en condiciones favorables al desarrollo del *B. cereus* (OMS, 1968).

B. Características generales de *Bacillus cereus*

El papel de *B. cereus* como causante de gastroenteritis se demostró por Hauge en Noruega en la década de los años cincuenta del siglo XX. Este microorganismo produce varios metabolitos extracelulares, que incluyen una enterotoxina diarreica y una emética, que se asocian a las dos formas de enfermedad transmitida por los alimentos que produce (Martino, Leyva, Puig, Hernández, Díaz, Reyes y Camejo, 2010).

Compite con otros microorganismos como *Salmonella* y *Campylobacter* en el intestino, por lo que su presencia reduce el número de los microorganismos. En animales como los pollos, conejos y cerdos, algunas cepas de *B. cereus* inofensivos se utilizan como aditivo en alimentos probióticos para reducir la *Salmonella* en los intestinos y el ciego. Esto mejora el crecimiento de los animales, así como la seguridad alimentaria para los seres humanos que comen su carne (Chavarrias, 2012).

B. cereus es una especie microbiana integrada por bacilos voluminosos, esporulados, con espora central o subterminal, que no aumenta el tamaño del microorganismo, generalmente móvil, mediante flagelos peritricos, aunque pueden existir especies inmóviles. Pueden agruparse en cadena y son bacilos gram positivo (Pascual y Calderón, 2000).

Debido a que es un microorganismo esporulado, tiene acceso a varios alimentos crudos: leche y productos lácteos, superficies de carnes crudas, incluida la de pollo, cereales y derivados, especias, materiales fecales del hombre y los animales (Pascual y Calderón, 2000). La espora también le confiere resistencia a condiciones ambientales extremas, tales como calentamiento, congelación, secado y radiación (Burgos, Urquijo, Echeverri, Lodoño, Gamboa y Salamanca, 2011).

C. Fuentes de *B. cereus*

B. cereus está ampliamente distribuido en la naturaleza y se aísla frecuentemente del suelo, el polvo y la vegetación. Se pueden encontrar concentraciones bajas de esporas o células en casi todos los alimentos (hortalizas, fruta, especias, leche, carne, etc.). El suelo puede contener concentraciones entre 10^3 y 10^5 esporas por gramo y es la fuente primaria de contaminación de los alimentos (Acsa brief, 2011). Se considera inevitable la presencia de *B. cereus* en las materias primas e incluso se ha detectado en materiales de envasado. Además, esta bacteria es capaz de contaminar alimentos transformados gracias, por un lado, a la gran resistencia de sus esporas, a los tratamientos térmicos (pasteurización, cocción, secado, pulverización) y por otro lado, a la capacidad de dichas esporas para adherirse fuertemente a las superficies de acero inoxidable y acumularse en los equipos, especialmente de los sistemas cerrados, como los intercambiadores de calor. De esta manera, los equipos pueden transformarse en reservorio de esporas (Bartram, 2003).

D. Características de crecimiento y sobrevivencia de *B. cereus*

Algunas cepas son psicrófilas, siendo capaces de crecer entre 4-5°C, pero no a 30-35°C. La temperatura óptima de crecimiento de *B. cereus* es de 37°C y la temperatura máxima para la germinación de esporas es de 50°C (Pascual y Calderón, 2000).

Los límites de crecimiento de *B. cereus* varían ampliamente en sus características de crecimiento y supervivencia (Anexo 1).

Las esporas de *B. cereus* pueden mantenerse viables en el arroz seco, hasta por 48 semanas, pero si el aw (actividad de agua, es el agua disponible en el alimento para el crecimiento de microorganismos) aumenta a 0,78 la viabilidad puede reducirse a 16 semanas. Una característica importante de esta bacteria es la habilidad de la spora a sobrevivir al proceso de ebullición durante la cocción del arroz y durante su enfriamiento, que induce la germinación y la producción de la toxina. *B. cereus* puede alcanzar poblaciones de 10^7 microorganismos/g en un periodo de incubación de 24 horas a 26°C y de 10 a 32°C (Burgos, et al, 2011).

E. Factores implicados en la proliferación de *B. cereus*

La información epidemiológica indica que, los factores más importantes relacionados en la aparición de brotes por intoxicaciones alimentarias, son las operaciones inadecuadas que se efectúan luego de la cocción, como el enfriamiento lento que permite que algunas partes del alimento mantengan temperaturas peligrosas de 10°C y 60°C por más de 4 horas. 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 (Tallent, Rhodehamenl, Harmon & Bennett, 2012).

Cuando los alimentos se preparan de modo que la temperatura se mantenga entre 30° y 50°C grados se permite la proliferación vegetativa, cuando se les deja enfriar de forma lenta, las esporas se multiplican y elaboran la toxina. Las esporas resistentes al calor sobreviven a la ebullición y germinan como sucede cuando el arroz hervido se deja fuera del refrigerador (Tallent, et al, 2012).

El crecimiento y la multiplicación de las células vegetativas ocurren típicamente dentro del rango de temperaturas de 10-48°C, mientras que el óptimo se encuentra entre 28-35°C. Sin embargo, se han identificado variantes psicrótróficas de *B. cereus* en leche cruda y pasteurizada capaces de crecer e iniciar la descomposición a temperaturas tan bajas como 5°C. El pH óptimo de crecimiento de las células vegetativas se encuentra entre 4,3 y 9,3. El rango mínimo de actividad del agua para el crecimiento vegetativo es de 0,912-0,950. Cuando carecen de nutrientes las células vegetativas esporulan, lo cual les permite sobrevivir largos períodos de carencia nutricional. Las esporas resisten una serie de factores ambientales como altas temperaturas (D100°C en leche descremada hasta 3 minutos, D 121°C en aceite vegetal hasta 30 minutos, D 95°C en agua destilada de 1,5-36 minutos), radiaciones y reactivos químicos (Pérez, 2012).

B. cereus es una bacteria cuyo crecimiento óptimo tiene lugar entre los 28 y 35°C, condiciones imperantes preferentemente en países tropicales, lo cual junto con los nutrientes aportados por los alimentos preparados y no consumidos inmediatamente pueden propiciar la germinación de las esporas, la rápida multiplicación de esta bacteria y con ello

la formación y acumulación en el alimento de las toxinas y la aparición posterior de la enfermedad (Pérez, 2012).

F. Recomendaciones especiales para prevenir la proliferación de *B. cereus*

Por la naturaleza ubicua de la espora en materias primas como el arroz es casi imposible reducir la presencia de *B. cereus*, por lo que, las medidas para reducir el riesgo de causar intoxicación deben orientarse a los productos preparados y listos para consumo (Chavarrias, 2012).

Las temperaturas entre 80-98°C durante la preparación del arroz, no son suficientes para destruir las esporas de *B. cereus*, por lo que las medidas para evitar la multiplicación incluyen: mantenimiento del alimento a temperaturas >60°C (en la superficie) y por tiempos menores a 80 minutos, preparar cantidades pequeñas, en caso de sobrar parte del alimento, éstos deben almacenarse por debajo de 4°C (Burgos, et al, 2011).

Otras medidas incluyen: mantener los alimentos calientes por encima de 55°C o enfriarlos rápidamente, preparar pequeñas cantidades, seguido por el almacenamiento en refrigeración, evitar el almacenamiento a temperatura ambiente por periodos superiores a dos horas (Burgos, et al, 2011).

G. Formación de la espora de *B. cereus*

La espora se forma con fines de dispersión y supervivencia por largo tiempo en condiciones adversas. Su formación generalmente es inducida por restricciones en los nutrientes o cuando las condiciones de crecimiento no le son favorables. *B. cereus* produce esporas en condiciones normales, su estructura es la de una espora subterminal elongada, ésta es de importancia para la difusión de *B. cereus* y en algunas cepas se conoce la adherencia de esporas a células epiteliales humanas, lo cual ha aumentado los mecanismos de virulencia (Burgos, et al, 2011). La germinación de la espora se facilita en presencia de L-alanina, y ésta es afectada por cambios en la temperatura. Su germinación e inicio del crecimiento es dependiente de las condiciones ambientales (Bartram, 2003).

Además, las esporas de *B. cereus* son muy hidrofóbicas y poseen exosporium, apéndices y/o pili por lo que se adhieren con facilidad a multitud de superficies. Dichas características contribuyen a la formación de biopelículas, lo que les hace más resistentes a los desinfectantes o detergentes utilizados persistiendo en las instalaciones y constituyendo una vía de contaminación frecuente de los alimentos. En la industria de alimentos se ha observado que este microorganismo se puede adherir a las superficies incluso el acero inoxidable, lo que favorece su permanencia dentro de las plantas de alimentos. También se ha encontrado en materiales de empaque (Martínez, 2008).

H. Comportamiento de las esporas de *B. cereus* en el arroz

El arroz es el cereal más cultivado en el mundo y el segundo de mayor consumo después del trigo. El alto consumo de este grano a nivel mundial es uno de los factores que favorece su implicación en brotes de origen alimentario y de uno de los patógenos más importantes ligado a este producto es *B. cereus* (Coto, Chavez, Gamboa y Arias, 2012).

Este grano debido a su composición nutricional (proteínas, grasas y alto contenido de carbohidratos) es un excelente medio de cultivo para *B. cereus*, sin embargo, por su bajo contenido de agua, no permite la multiplicación del bacilo. Las esporas de *B. cereus* pueden contaminar el arroz desde el cultivo y germinar cuando el arroz haya sido procesado mediante método de cocción (Padilla, 2007).

B. cereus, no es un microorganismo competitivo, pero presenta un buen crecimiento después de cocinar el alimento y dejarlo enfriar a menos 48°C. El tratamiento con calor causa la germinación de las esporas y, en ausencia de bacterias competitivas, *B. cereus* puede crecer de manera óptima (Padilla, 2007).

Las esporas de *B. cereus* pueden mantenerse viables en el arroz seco, hasta por 48 semanas, pero si el aw aumenta a 0.78, la viabilidad puede reducirse a 16 semanas. Tienen la habilidad de sobrevivir al proceso de ebullición durante la cocción del arroz y durante su enfriamiento, que induce la germinación y la producción de la toxina. *B. cereus* es capaz de producir la toxina a temperaturas de 15°C en arroz y su detección se logra después de 48 horas en esta temperatura (Burgos, et al, 2011).

El arroz usualmente almacenado con un porcentaje de humedad de 12-14%, bajo estas condiciones es imposible que las formas vegetativas de *B. cereus* se multipliquen aunque sus esporas pueden sobrevivir. El arroz blanco, puede contener desde 46-100% de contaminación con este microorganismo (Chavarrías, 2012).

Cuando el arroz es cocido con agua, leche, huevos u otros ingredientes, se genera un ambiente adecuado para la germinación de las esporas, el crecimiento de la bacteria y la síntesis de la toxina. El recalentamiento del arroz antes del consumo puede reducir el número de células viables, pero no inactiva la toxina emética, niveles de 0.01-1.28 µg/g de la toxina se han encontrado en cereales incluido el arroz (Burgos, et al, 2011).

I. Toxinas producidas por *B. cereus*

B. cereus está implicado en toxoinfecciones alimentarias, particularmente asociado al consumo de arroz contaminado, y también en algunos procesos infecciosos en seres humanos y animales (Duce y Bordenave, 2012).

Las cepas diarreogénicas que son asociadas a brotes alimenticios e infecciones oportunistas sintetizan un complejo de enterotoxinas que incluyen la enterotoxina T (BcET), la hemolisina BL (HBL), la enterotoxina no hemolítica (Nhe) y la citotoxina K (CytK), así como una toxina emética conocida como cerúlida. Las enterotoxinas arriba mencionadas, que son termolábiles y susceptibles a la degradación proteolítica, pueden encontrarse en los alimentos o ser sintetizadas por la bacteria dentro del intestino delgado de los humanos. La toxina emética, por el contrario, resiste más de una hora a 150°C, lo cual hace que sea posible encontrarla activa en productos que durante su manufactura son sometidos a elevadas temperaturas, como es el caso de las leches deshidratadas (Blanco, 2009).

Esta bacteria ha sido relacionada con una amplia gama de patologías, además de las más comunes también se ha relacionado con infecciones del tracto respiratorio, urinario, sistema nervioso central, endocarditis, osteomielitis, endoftalmitis, entre otras. La patogenicidad de esta bacteria, ya sea en infecciones intestinales o extra intestinales, se encuentra íntimamente asociada con la producción de exoenzimas o toxinas. Dentro de estas toxinas se describen cuatro hemolisinas, tres fosfolipasas, una toxina emética (cerúlida), y tres

enterotoxinas formadoras de poros: la hemolisina BL (Hbl), la enterotoxina no hemolítica (Nhe), y la citotoxina K (Coto, et al, 2012).

B. cereus produce principalmente dos enterotoxinas: la toxina diarreica y la toxina emética. Los síntomas de la toxiinfección tienen dos formas de presentación con presencia de diarrea, dolores abdominales y vómitos (OPS/OMS, 2010).

Las cepas de *B. cereus* que producen la toxina emética crecen bien en platos con arroz y otros alimentos farináceos, mientras que las cepas que producen la toxina diarregénica crece en una amplia variedad de alimentos que van desde vegetales hasta salsas y guisados. Numerosas hierbas desecadas, especias para condimentar y alimentos deshidratados han mostrado presencia de esta bacteria (Pérez, 2012).

1. Toxina emética

La toxina emética produce el síndrome emético, con un periodo de incubación de 1 a 5 horas, produce vómitos y náuseas, el proceso dura 24 horas: Es una toxina cereulida o termoestable, es sintetizada en la fase estacionaria de crecimiento. Se obtiene principalmente por el consumo de arroz contaminado (Pérez, 2012).

Esta toxina provoca los síntomas mencionados entre 0.5-6 horas después del consumo del alimento contaminado. Los síntomas son similares a los de la intoxicación por *Staphylococcus aureus*, y su rápida aparición indican la presencia de la toxina preformada en el alimento, llamada “cereulida”. Un péptido cíclico termoestable pequeño de 1.2 KDa, termorresistente (es estable a 126°C por 90 minutos) y acidorresistente (pH estable 2-11), esta toxina no pierde su actividad a temperaturas bajas, es tolerante a pH extremos y es estable a tratamientos con pepsina y tripsina. Pertenece a la familia de los ionóforos de potasio. Esta toxina afecta el nervio vago a través de la unión al receptor 5-HT3 ocasionando daño celular al actuar como ionóforo de potasio. Interfiere en la fosforilación oxidativa, lo que provoca la inactivación de las mitocondrias, que constituye el mecanismo de su toxicidad. Los primeros datos sobre su toxicidad se obtuvieron en ensayos con animales, evidenciando su capacidad de producir emesis. Posteriormente se desarrollaron

métodos más accesibles como los ensayos con líneas celulares HEp-2 o con esperma, en los que provocan vacuolización o parálisis (Martínez, 2008).

2. Toxina diarreica

La ingesta de la toxina diarreica produce el síndrome diarreico, teniendo un periodo de incubación de 8 a 16 horas, causa diarrea y dolor abdominal. Los principales alimentos en donde se puede encontrar son carnes y productos derivados del pollo, sopas deshidratadas, embutidos, especias, en los productos derivados de la vainilla, cereales, harinas, clara de huevo deshidratada, y frutas como durazno y piña (Pérez, 2012).

El síndrome diarreico está asociado a la producción de varias toxinas, la enterotoxina HBL, la enterotoxina NHE y la citotoxina K. Su sintomatología coincide con la de la intoxicación por *Clostridium perfringens*. La enterotoxina HBL es una proteína con actividad hemolítica, dermonecrotizante, que afecta la permeabilidad vascular y provoca una acumulación de líquido en los ensayos en el asa ileal ligada de conejo. Se compone de tres subunidades y está codificada por 4 genes organizados en un operón: el gen *hbIA*, el gen *hbIB*, el gen *hbIC* y el gen *hbID*. Esta toxina se produce durante el crecimiento de *B. cereus* en el intestino delgado (Martínez, 2008).

La toxina no hemolítica NHE posee una estructura similar a la HBL, y esta codificada por los genes, *nheA*, *nheB* y *nheC*, en el operón *nhe*. La enterotoxina es citotóxica al igual que HBL, pero no es hemolítica. Esta enterotoxina se produce durante el crecimiento vegetativo del microorganismo en el intestino delgado del huésped (Martínez, 2008).

La citotoxina K es una proteína con actividad hemolítica, necrotizante y citotóxica, codificada por el gen *cytK*. Fue aislada en cepas implicadas en una toxiinfección alimentaria, en la que se registraron 3 muertes (Lund, De Buyser & Granum, 2000). Su toxicidad se debe a la formación de poros en la membrana celular, como en las toxinas B de *C. perfringens* y *S. aureus*, provocando la pérdida del equilibrio osmótico celular (Martínez, 2008).

J. Producción de toxinas por otras especies de *Bacillus*

Existe la percepción general que *B. cereus* es la única especie productora de ETA; sin embargo, otras especies son capaces de producir intoxicación alimentaria, se ha encontrado que *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* han estado presentes en brotes alimentarios (Burgos, et al, 2011). Además, algunas cepas de *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. anthracis* producen la toxina diarreica, se encuentran en el suelo y han estado asociados a arroz, ver características en Anexo 2 (Chavarrías, 2012).

En relación con los alimentos, los brotes de intoxicación alimentaria atribuibles a *B. subtilis* han sido muy ocasionales. Se ha descrito la producción de una toxina extracelular, la subtilina, de escasa toxigenicidad y únicamente relacionada con el desarrollo de reacciones alérgicas en individuos que trabajan con cultivos industriales de esta especie bacteriana. Además, se ha descrito la producción de una toxina no proteica termoestable, la amilosina, que sería formadora de canales de iones en las membranas celulares (Instituto Valenciano de Microbiología, s.f).

Se reportó un brote de intoxicación alimentaria en febrero de 2000 en un jardín de infancia causado por leche en polvo que contenía *B. subtilis* y *B. licheniformes* toxigenico, en la ciudad de Split, Croacia. De los 25 niños expuestos, 12 exhibieron síntomas como: náusea, dolor de cabeza y vómitos, 5-8 horas después del desayuno que consistía en sandwiches de jamón y leche con cacao reconstituida en polvo. Se examinaron las muestras de leche y cacao en polvo en paralelo usando medios no selectivos. La contaminación de la leche en polvo con la producción de la toxina de *B. licheniformis* y *B. subtilis* se demostró mediante el ensayo de vacuolización y la prueba de cultivo celular MTT. El examen de leche reconstituida realizado en el laboratorio mostró que ambas especies de *Bacillus* fueron capaces de entrar en la fase logarítmica de crecimiento dentro de 2 horas de almacenamiento de la leche reconstituida a temperatura ambiente (Sinisa, Moira, Ivo, Danja, Mladen, Marion & Darko, 2005).

K. Brotes de *B. cereus*

La confirmación de brotes y casos esporádicos por *B. cereus*, asociados al consumo de alimentos, se dificulta en ocasiones por la amplia distribución de la bacteria en el ambiente que facilita su acceso a los alimentos en bajas concentraciones, ya que no se realizan frecuentemente estudios para la búsqueda intencional de este microorganismo en el alimento y debido a su similitud con los síndromes gastrointestinales que producen *S. aureus* y *C. perfringens* (Martino, et al, 2010).

En Colombia *B. cereus* es la tercera causa de brotes en este país, donde los alimentos listos para consumo no industriales son los más frecuentemente involucrados (arepa, arroz con pollo, empanada de harina). Se han reportado 29 brotes en el periodo 2007-2010 por este agente (Burgos, et al, 2011).

En un estudio realizado en la Habana Cuba en 2010, se encontró que *B. cereus* se aisló en el 20,4% de las muestras analizadas, con mayor incidencia en platos de arroz y natilla y se consideró a este agente responsable del 24.6% de los brotes alimentarios analizados (Martino, et al, 2010).

En Europa, entre 1999-2000, *B. cereus* fue declarado el agente causal del mayor número de toxiinfecciones en los Países Bajos (Holanda) y el segundo en Alemania, correspondiente al 3.8% y 1.8% respectivamente del total de casos (Martínez, 2008). En España se notificaron 56 brotes causados por *B. cereus* en el periodo de 1994-2003. Éstos brotes representan el 0.9% de las intoxicaciones registradas, ocupando un quinto lugar entre los agentes etiológicos de origen bacteriano (Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2003).

En Estados Unidos, entre los años 1999-2004, el 2.5% de las toxiinfecciones alimentarias fueron causadas por *B. cereus*, ocupando un séptimo lugar entre los agentes etiológicos de tipo bacteriano. En septiembre de 1998 se reportó un brote por *B. cereus* con un total de 26 personas afectadas en Mississippi, donde los alimentos implicados fueron carne picada, salchicha, frijoles y camarones (CDC, 2004).

1. Brotes de *B. cereus* en Guatemala

El departamento de epidemiología del Ministerio de Salud y Asistencia Social reportó 500 casos de brotes de intoxicación por alimentos en los años 2004 al 2007 y de ellos 16 eran por intoxicación por *B. cereus*. La Organización Panamericana de la Salud reportó 469.705 casos y notificó que las ETA fueron la segunda causa de morbilidad en este país. Este informe mostró que los principales agentes identificados fueron *S. aureus*, *B. cereus*, *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *V. cholerae* y *E. coli* (OPS/OMS, 2006).

L. Efectos adversos en la salud de *B. cereus*

La patogénesis por *B. cereus* en el tracto gastrointestinal se debe a que las células vegetativas ingeridas producen y secretan las enterotoxinas que inducen el síndrome diarreico (Hbl, Nhe y citotoxina K); o a la toxina emética, un péptido cíclico codificado por un plásmido, que es producida en los alimentos y es ingerida ya preformada (Martino, et al, 2010). Aunque se han descrito casos del tipo emético asociados con niveles de *B. cereus* de 10^3 UFC/g de alimento contaminado, se estima que la dosis infectiva mínima para ambos tipos de síndrome, se encuentra aproximadamente entre 10^4 - 10^8 UFC/g de alimento consumido. El tipo de síndrome que se presenta con mayor frecuencia varía de acuerdo al país en estudio, por ejemplo en Japón el síndrome emético es diez veces más frecuente que el diarreico, mientras que en Europa y Norteamérica es más frecuente el diarreico (Coto, et al, 2012).

Además de su capacidad para provocar intoxicaciones alimentarias, *B. cereus* también está involucrado en infecciones locales y sistémicas, especialmente asociadas con pacientes inmunocomprometidos, neonatos, drogodependientes y pacientes con heridas quirúrgicas traumáticas y catéteres. Las cepas aisladas de este tipo de infecciones han mostrado su habilidad para sintetizar exotoxinas necrotizantes semejantes a hemolisinas y fosfolipasas. Las infecciones en las heridas postoperatorias o postrauma causadas por *B. cereus* se asocian con la producción de un factor de permeabilidad vascular dermonecrótico, HBL. Las infecciones severas por esta bacteria no son comunes. La bacteriemia en la mayoría de los casos es transitoria y nada peligrosa, pero ocasionalmente causan serias infecciones. Las cepas de *B. cereus* aisladas de las infecciones se han mostrado sensibles a

cloranfenicol, clindamicina, vancomicina, gentamicina, estreptomina, eritromicina y son usualmente resistentes a los antibióticos *B*-lactámicos incluidas las cefalosporinas de tercera generación. La explicación se halla en que esta bacteria produce tres tipos diferentes de *B*-lactamasas, la *B*-lactamasa I o tipo A, es una penicilinasas extracelular con una serina en el sitio activo; *B*-lactamasa II o tipo C, que se activa con la unión de los iones cinc y cobalto y la III, que es una lipoproteína de clase A unida a membrana que tiene además una forma secretada (Pérez, 2012).

M. Intoxicación por *B. cereus*

La intoxicación alimentaria por *B. cereus* se describió por primera vez en 1950 luego del consumo de salsa de vainilla contaminada. Además de este primer estudio, esta bacteria se ha identificado en otros brotes, muchos de los cuales no fueron notificados debido a que sus síntomas generalmente son leves, autolimitados o se confunden con los de otros patógenos (Pérez, 2012).

La intoxicación alimentaria origina dos síndromes clínicos. El primero es llamado emético que se asemeja a la intoxicación alimentaria por estafilococos, con un lapso breve de incubación y se caracteriza por vómitos, dolor abdominal y diarrea en 33%. El segundo es el síndrome diarreico que a semejanza de la intoxicación por *C. perfringens*, con un periodo de incubación largo, se caracteriza por cólicos abdominales y diarrea acuosa (Arias, Blanco, Chávez, Pérez y Rodríguez, 2009).

La intoxicación alimentaria se define como cualquier enfermedad de naturaleza tóxica o infecciosa causada por el consumo de alimentos o líquidos. El término es habitualmente usado para describir la enfermedad, usualmente vómitos o diarreas causadas por bacterias, virus o parásitos. Se ha demostrado que este microorganismo produce siete tipos de toxinas: la cereulida (toxina emética), la cual ha sido ampliamente caracterizada en los últimos años, tres enterotoxinas (hemolisina BL o HBL, no-hemolítica o NHE y enterotoxina T o EntT), las cuales lo hacen responsable de dos síndromes, el síndrome emético y el diarreico, además de tres fosfolipasas (Pérez, 2012).

Debido a que la intoxicación alimentaria por *B. cereus* no es de reporte obligatorio en ningún país (Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2013). Los pocos países que han realizado estudios a profundidad sobre este patógeno han encontrado que *B. cereus* es un agente etiológico frecuente en intoxicaciones alimentarias; en Noruega e Islandia se reportaron porcentajes de aislamiento en intoxicaciones alimentarias entre 47-22%, respectivamente. Asociando a lo anterior, la presencia de *B. cereus* en los alimentos, se puede relacionar de manera que se logre esclarecer realmente el riesgo sanitario del consumo de los alimentos contaminados por este (Duce y Bordenave, 2012).

1. Mortalidad de *B. cereus*

La tasa de mortalidad por este microorganismo es baja, se han reportado dos casos esporádicos de muerte asociados al síndrome emético, donde la concentración de toxina fue excesiva y se presentaron daños hepáticos, pero si asocia la desnutrición contribuye significativamente, en forma directa e indirecta, a aumentar la morbilidad y mortalidad. Se considera que su efecto negativo sobre la respuesta inmunológica contribuye (Schneider, 2005).

Se han registrado al menos 2 casos de muerte causada por la toxina cereulida por consumo de espagueti al pesto en Zurich, Suiza (Mahler, Pasi & Kramer, 1997) y de ensalada de pasta en Bruselas, Bélgica (Dierick, Van Coillie, Swiecicka, Meyfroid, Devlieger & Meulemans, 2003).

B. cereus causa una diversidad de infecciones sistémicas y locales tanto en individuos inmunocompetentes, como inmunocomprometidos, siendo los más frecuentes neonatos, drogadictos (vía endovenosa), pacientes que usan catéteres (Burgos, et al, 2011).

2. Dosis respuesta de *B. cereus*

Los recuentos de *B. cereus* encontrados en alimentos involucrados en brotes varían de 200 a 10^9 microorganismos/g. Se requiere una dosis alta de células para causar la enfermedad, (más de 10^5 células/gramo) aunque esta concentración puede variar (Chavarrías, 2012).

Para la toxina emética se estima que la concentración de células debe ser de 10^5 a 10^9 UFC ingerida, aunque otros señalan concentraciones entre 10^3 a 10^{10} con una media de 10^{10} . En un brote ocurrido en Finlandia se encontró en el alimento una concentración de 1.4 $\mu\text{g/g}$ para la toxina emética, asumiendo que consumieron 300 g del alimento, la dosis infectiva fue de 450 $\mu\text{g/g}$. En otro brote ocurrido en Holanda se reportaron concentraciones de 0.03-13.3 $\mu\text{g/g}$ de alimento (Burgos, et al, 2011).

El número de *B. cereus* no refleja el riesgo de sufrir la intoxicación emética. Otro estudio realizado en Japón describió el rango de toxina emética encontrada en alimentos asociados a brotes de 0.01-1.28 mg/g. Debido a la gran estabilidad que presenta la toxina emética, el número de *B. cereus* en el alimento no necesariamente refleja el riesgo de intoxicación, por lo que la historia del procesamiento del alimento es importante para establecer si se presentaron las condiciones para la producción de la toxina. La dosis infectiva para intoxicaciones diarreicas es de 10^3 a 10^7 células. Un alimento que contenga en el momento de su consumo concentraciones superiores a 10^4 células, no es seguro y puede causar la enfermedad (Burgos, et al, 2011).

N. Alimentos asociados a *B. cereus*

Los alimentos crudos de origen vegetal son la mayor fuente de *B. cereus*. Se ha aislado de alimentos, incluyendo vegetales frescos y vegetales mínimamente procesados, cereales y derivados (principalmente arroz), especias, leche cruda y pasteurizada, derivados lácteos, carnes (crudas y derivados) y alimentos como miel, entre otros. La amplia distribución del microorganismo, permite que sobreviva en alimentos listos para consumo, especialmente en alimentos que contienen cereales y leche (Burgos, et al, 2011).

1. El arroz

De acuerdo al *Codex Alimentarius* se define al arroz como los granos enteros o partidos de la especie *Oryza sativa*. El arroz (genero *Oryza*) pertenece al grupo de los cereales. Existen 23 variedades de *Oryza*, pero para el consumo humano solo se cultivan dos: *Oryza sativa*, originaria del trópico húmedo de Asia y *O. glaverrina* de África Occidental. El arroz es el

alimento básico predominante para 17 países de Asia y el pacífico, nueve países de América del Norte y del sur y 8 países de África (Chavarrías, 2012).

El arroz contiene tiamina, riboflavina, niacina y fibra alimenticia. El arroz integral contiene más nutrientes que el arroz blanco sin cascara o pulido. Como alimento único, no puede proporcionar todos los nutrientes necesarios para una alimentación adecuada. Este cereal es un cultivo acuático, ya que requiere de mucha agua, sol, calor y suelos con características arcillosas para producirse (Gamarro, 2011).

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación (FAO) el arroz proporciona el 20% del suministro de energía alimentaria del mundo (Burgos, et al, 2011).

O. Métodos microbiológicos de identificación de *Bacillus cereus* en alimentos

1. Método de recuento en placa en superficie de *B. cereus*

Este método consiste en el recuento de bacterias viables, basado en el número de colonias que se desarrollan en placas de agar que han sido previamente inoculadas con cantidades conocidas del alimento diluido e incubadas en condiciones ambientales predeterminadas. Tales recuentos se denominan recuentos totales en placa, donde únicamente pueden contarse aquellas bacterias que pueden crecer en las condiciones ambientales elegidas; se pueden cambiar las condiciones ambientales, de incubación, la composición del medio del cultivo lo que favorece así el crecimiento de unos u otros microorganismos (Padilla, 2007)

En la determinación presuntiva de *B. cereus* se utilizan medios que contengan yema de huevo en su composición, para poner de manifiesto la lecitinasa, produciendo una zona opaca que rodea la colonia, mientras que otras bacterias formadoras de esporas por ejemplo, *B. thuringiensis*, por lo general no producen la zona opaca, o si la producen, es muy restringida. En los medios que contienen manitol y rojo de fenol como indicador, *B. cereus* no fermenta el carbohidrato y por lo tanto las colonias se presentan rodeadas por zonas de color rojo (Tallent, et al, 2012).

Los medios de cultivo recomendados para su determinación son, el agar selectivo para *B. cereus* según MOSSEL, agar yema de huevo-polimixina-rojo de fenol, agar yema de huevo piruvato, agar selectivo según REUTER y agar sangre de caballo en el cual se puede observar la hemólisis causada por cepas de *B. cereus* y es aplicable a cualquier alimento en el cual *B. cereus* esté viable y presente (Tallent, et al, 2012).

2. Técnica del Número Más Probable y el Método de Investigación de *B. cereus*

La norma ISO 21871:2006, comprende la técnica del “Número Más Probable” y el método de investigación de *B. cereus*. En este método la muestra es enriquecida en caldo TSPB (caldo triptona soja y polimixina B) y para el aislamiento de las colonias típicas se utiliza el agar PEMBA (“polymyxin pyruvate egg-yolk mannitol bromothymol blue agar”). Este medio se basa en el agar MYP, pero con ligeras modificaciones para favorecer la esporulación, y es el medio recomendado por la Federación Internacional de la Industria de Productos Lácteos (Martínez, 2008).

III. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala las ETA se registran entre las primeras diez causas de morbilidad y mortalidad en el país, este evento es notificado como síndrome diarreico, debido a que los servicios de salud no tienen capacidad de respuesta para la identificación del agente etiológico. Dicho inconveniente limita la implementación de medidas de control eficientes de las fuentes de infección o contaminación. Estas enfermedades dañan la salud y también repercuten en la economía del país, por lo que existe un doble impacto negativo. Las ETA influyen en la calidad de vida del individuo afectado, hay pérdidas económicas, conducen a ausencias laborales y gastos en atención médica (Schneider, 2005).

Según información proporcionada por la OPS en el año 2010, se reportaron 469.705 casos de ETA y se notificó que estas fueron la segunda causa de morbilidad en el país. En este informe se mostró que los principales agentes identificados fueron *S. aureus*, *B. cereus*, *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *V. cholerae* y *E. coli*.

En otros países se ha notificado a *Bacillus cereus* como el responsable de brotes alimentarios. En Cuba se aisló a este microorganismo en el 20.4% de las muestras, considerándose a este como el agente causal de los brotes alimentarios analizados. En España se notificaron 56 brotes causados por *B. cereus* en el periodo 1994-2003. Y también se han registrado 2 casos de muerte causados por la toxina cereulida en Suiza y Bélgica.

En Guatemala no hay estudios acerca de *Bacillus cereus* debido a la baja letalidad de la enfermedad, o a su desconocimiento como agente etiológico de ETA. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue investigar la presencia de *B. cereus* a partir de muestras de arroz frito preparado listo para su consumo en los diferentes restaurantes de comida china de la zona 1 de la ciudad capital de Guatemala, debido a que es en esta zona donde se encuentra una mayor cantidad de restaurantes, donde se prepara este alimento.

Por lo descrito, la presente investigación se realizó para el avance técnico científico en inocuidad de alimentos, para lo cual es necesario el registro específico de agentes etiológicos causantes de intoxicaciones alimentarias. El presente estudio enriqueció los

datos epidemiológicos y el conocimiento de *B. cereus* como uno de los agentes causales de las ETA en Guatemala.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar y cuantificar *Bacillus cereus* en arroz frito preparado para consumo en restaurantes de comida china de la zona 1 de la ciudad capital de Guatemala.

Objetivos específicos

1. Determinar la presencia y la cantidad de *B. cereus* en las variantes de arroz frito (pollo, lomito y mixto) preparado para consumo en restaurantes de comida china de la zona 1 de la ciudad capital de Guatemala.
2. Establecer si las muestras de arroz recolectadas en los restaurantes de comida china de la zona 1 de la ciudad capital de Guatemala son aptas para el consumo humano de acuerdo a los criterios microbiológicos aceptables según la norma del *Codex alimentarius* para el arroz.

V. HIPÓTESIS

El siguiente estudio es de tipo descriptivo observacional, por lo cual no se aplica la formulación de hipótesis.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo

Platos de arroz chino frito de pollo, lomito y mixto preparados para el consumo humano de nueve restaurantes ubicados en la zona 1 de la Ciudad Capital de Guatemala.

B. Muestra

De los nueve restaurantes de comida china, reconocidos por el Ministerio de Salud Pública (MSPAS), se recolectarán diferentes variantes de platos de arroz frito (pollo, lomito y mixto). De cada restaurante se obtuvieron tres platos de cada tipo, y se recolectarán en tres muestreos repetidos de los restaurantes seleccionados, en un período de tiempo entre cada muestreo de 15 días, para obtener un total de ochenta y uno platos de arroz frito.

C. Recursos humanos

Seminaristas: Aleida Elizabeth Muñoz Vásquez, Silvia Eugenia Pereira Noriega, Melanie Dessíre Alonzo Cuyán

Asesor: MSc. Martín Nestor Fernando Gil Carrera

D. Recursos institucionales

Laboratorios del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y el Laboratorio de Análisis Fisicoquímicos y Microbiológicos (LAFYM).

E. Recursos Materiales

1. Equipo de laboratorio
 - Stomacher (homogeneizador)
 - Incubadora a 30⁰C +/- 2
 - Refrigeradora
 - Mecheros
 - Balanza semianalítica

- Termómetros
- Pipetas automáticas 100-1000 µL
- Pipetas automáticas 1000-5000 µL
- Autoclave
- Campana de flujo laminar
- Microscopios ópticos
- Vortex

2. Reactivos y Medios de cultivo

- Agar agua peptonada
- Agar Mossel
- Solución de sulfato Polimixina B
- Emulsión de yema de huevo al 50%
- Caldo nitrado
- Agar sangre de oveja
- Agar nutritivo
- Solución de ácido sulfanílico
- Solución en ácido acético de alfa-naftilamina
- Solución de peróxido de hidrógeno 30%
- Colorantes para tinción de Gram
- Aceite de inmersión
- Colorante verde de malaquita

3. Cristalería

- Erlenmeyer
- Tubos de ensayo con rosca y tapadera
- Frascos de laboratorio de 500 mL con tapadera
- Probeta de 25 mL
- Probeta de 100 mL

- Láminas portaobjetos
- Pipetas volumétricas de 1 mL
- Pipetas volumétricas de 10 mL
- Varillas de vidrio dobladas

4. Microorganismos

- Cepa ATCC 4342 de *B. cereus*

5. Instrumentos varios

- Guantes
- Paletas de madera estériles
- Cofias
- Mascarillas
- Tips
- Bolsas estériles ziploc
- Cajas de Petri
- Lapiceros
- Marcadores permanentes
- Asas bacteriológicas
- Gradillas
- Hielera
- Bata
- Hielo seco
- Papel craft
- Papel encerado

F. Metodología

Se recolectarán veintisiete platos de arroz frito de lomito, veintisiete platos de arroz frito mixto y veintisiete platos de arroz frito de pollo, para obtener un total de ochenta y un muestras, de los nueve restaurantes seleccionados ubicados en la zona 1 de la ciudad

Capital. Las muestras se recolectarán en tres muestreos a diferentes intervalos de tiempo y se transportarán al laboratorio en hieleras a 6⁰C con hielo seco, para realizar el análisis microbiológico.

1. Metodología según el manual de análisis bacteriológico (Bacteriological Analytical Manual)

a. Preparación de la muestra: Pesar 50 gramos de muestra, añadir a 450 mL de caldo Butterfield tamponado con fosfato (dilución 1:10) y mezclar durante 2 minutos a alta velocidad (10,000-12,000 rpm). Preparar diluciones seriadas de 10⁻² a 10⁻⁶, transferir 10 mL de muestra homogenizada (dilución 1:10) a 90 mL de dilución en blanco, mezclar bien con agitación vigorosa, y continuar hasta llegar a la dilución 10⁻⁶. Inocular en agar Bacara o agar PAI en placas por duplicado mediante difusión 0.1 mL de cada dilución (Tallent, et al, 2012).

b. Confirmación de *B. cereus*: Realizar tinción de gram, inocular en caldo glucosa-rojo fenol, caldo nitrado, medio VP modificado, agar tirosina, caldo lisozima y agar PAI. Las características básicas de este microorganismo son compartidas con otros miembros del grupo *Bacillus*, incluyendo la cepa *B. mycoides*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis*. Sin embargo, estas especies por lo general pueden ser diferenciadas de *B. cereus* determinando características específicas propias de cada especie (Tallent, et al, 2012).

c. Pruebas para la diferenciación de los miembros del grupo de *B. cereus*: son las siguientes: prueba de movilidad, crecimiento rizoide, actividad hemolítica, cristales de toxina de la proteína y pruebas para cepas psicotolerantes (Tallent, et al, 2012).

Nota: la fase de confirmación no permite la distinción entre *B. cereus* y otras especies de *Bacillus* estrechamente relacionadas pero aisladas con menor frecuencia, tales como *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* y *B. mycoides* (RENALOA, 2013).

Con el fin de tener un ensayo más práctico, la fase de confirmación ha sido restringida al aspecto típico de las colonias en agar MYP y a los test de catalasa, Gram, crecimiento rizoide y prueba de nitratos, descritos después.

2. Procedimiento de análisis de las muestras

El procedimiento consistió en tomar muestras con un “n” (número de unidades de muestra) igual a cinco. Se transportaron de forma rápida al laboratorio y se refrigeraron hasta el momento de procesarlas. Se realizó una dilución 1:10 en diluyente apropiado (agua peptonada fosfato) por cada muestra, se homogenizó instrumentalmente por dos minutos aproximadamente a 2,000 rpm en el homogeneizador (stomacher) y se prepararon las diluciones seriadas, se inoculó en superficie en medio selectivo cuantitativo en placa, agar manitol. Se incubaron las placas a 30°C durante 24 y/o 48 horas (David, 2003).

3. Aislamiento del microorganismo

Se pesó de forma aséptica 25 gramos de muestra y se añadieron 225 mL de agua peptonada (dilución 1:10). Se pasaron por el Stomacher hasta conseguir homogenización. A partir de esta dilución, se transfirió 1 mL de muestra en 9 mL de agua peptonada (dilución 1:100). De esta dilución se transfirió 1 mL de muestra en 9 mL de agua peptonada (dilución 1:1000) (Ramírez, 2012).

4. Cuantificación del microorganismo

Se inoculó por duplicado en placas de Petri con manitol-yema de huevo-polimixina, con 0.5 mL de cada dilución y se distribuyó sobre la superficie del medio. Se incubaron a 30°C durante 24-30 horas (Ramírez, 2012).

5. Identificación presuntiva

Las colonias de *B. cereus* son usualmente de color rosado que se intensifica después de incubación adicional, las colonias están rodeadas por una zona de precipitado que indica la producción de lecitinasa (Ramírez, 2012).

6. Pruebas para diferenciar los miembros del grupo *B. cereus*

Las siguientes pruebas fueron útiles para diferenciar cepas típicas de *B. cereus* de otros miembros del grupo *Bacillus* que incluyen *B. mycoides*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis* (Ramírez, 2012).

a. Tinción de Gram

Se preparó un frotis, se realizó la tinción de gram y se examinó microscópicamente. *B. cereus* es un bacilo gram positivo que forma cadenas cortas y largas; presenta esporas elipsoidales, centrales y subterminales que no hinchan el esporangio (Tallent, et al, 2012).

b. Tinción de esporas por el método Wirtz-Conklin

Se preparó un frote y se cubrió con solución de verde de Malaquita, se calentó hasta la liberación de vapores por 6 minutos (evitar ebullición y agregar colorante si se deshidrata la lámina). Se enjuagó con agua de chorro con suavidad. Se cubrió con solución de safranina durante 30 segundos, se lavó con agua y secó al aire. Se examinó al microscopio con objetivo de inmersión, se observó la espora de color verde y la célula de color rosa (Paulo, 2005).

c. Prueba de catalasa

Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 30 % sobre un portaobjetos. Las burbujas de gas indicaron positivo a la prueba (Tallent, et al, 2012).

d. Prueba para la actividad hemolítica

Se sembraron las colonias seleccionadas a partir de las placas de agar manitol-yema de huevo-polimixina en la superficie de agar sangre de oveja, a modo de obtener colonias aisladas que permitieran una buena interpretación de la reacción de hemólisis. Se incubó a 30⁰C durante 24 horas y se observó la reacción de hemólisis. Cada colonia rodeada de una zona clara se consideró hemólisis positiva (RENALOA, 2013).

e. Crecimiento rizoide

Se prepararon placas con 18 mL de agar nutritivo y se dejaron secar 1-2 días a temperatura ambiente. Se inoculó el centro de la placa con una azada de suspensión del cultivo sospechoso. Se dejó incubando 48-72 horas a 30°C. Se examinaron las placas y se observó crecimiento rizoide, que se caracterizó por la producción de colonias con estructuras parecidas a cabello largo, que se extienden desde el sitio de inoculación. *B. cereus* frecuentemente produce colonias tipo galaxia que no deben confundirse con el crecimiento rizoide, el cual es característico de *Bacillus mycoides* (Ramírez, 2012).

f. Prueba sobre nitratos

Se inoculó en 5 mL de caldo nitrado una azada de colonias sospechosas de *B. cereus*. Se incubaron los tubos por 24 horas a 35°C. Se añadieron 0.25 mL de cada uno de los reactivos de ensayo de nitritos (ácido sulfanílico y N-etilendiamina) a cada tubo. Un color anaranjado, que se desarrolló dentro de 10 minutos, indicó que el nitrato fue reducido a nitrito (Tallent, et al, 2012).

G. Diseño estadístico

1. Población

Arroz frito de restaurantes de comida china de la zona 1, identificados por el Ministerio de Salud Pública (MSPAS).

2. Variantes de arroz frito

- Pollo
- Lomito
- Mixto

3. Tipo de muestreo

Por conveniencia. De cada restaurante se adquirió una muestra de cada variante de arroz, con un muestreo repetido de tres veces, en los mismos restaurantes y tipos de arroz frito.

4. Análisis:

a. Tipo de estudio: Descriptivo

- Presencia / ausencia de *B. cereus* con frecuencias absolutas.
- Se clasificaron según la norma del Codex alimentario (Anexo 3) para la determinación de:
 - Apto para el consumo humano.
 - No apto para el consumo humano.
 - La clasificación anterior se realizó por el tipo de arroz.
- Cuantificación de los positivos: UFC/g, mediante los resultados se expresaron por medio de mediana y rango.

b. Cálculos y expresión de los resultados (ISO 7218:2007)

Para el cálculo y expresión de resultados se siguieron los requisitos generales establecidos en la Norma ISO 7218 salvo que la norma ISO 7932 para recuento de *B. cereus* en placa indique otros requisitos específicos (RENALOA, 2013).

1. Método de cálculo

Para que un resultado sea válido, se suele considerar necesario que el recuento de colonias se realice al menos en una placa que contenga un mínimo de 15 colonias sospechosas (de acuerdo a la norma específica ISO 7932 para recuento de *B. cereus* en placa) (RENALOA, 2013).

2. Método de cálculo después de la confirmación

En este método donde se requiere de una confirmación para el recuento, se identifica un número de colonias sospechosas (*A*) que se someten a confirmación.

Tras la confirmación calcular el número de colonias de cada placa (a) que cumplen con los criterios de la confirmación, utilizando la siguiente ecuación:

$$A = \frac{b}{a} \times C$$

Donde:

b : es el número de colonias que cumplen con los criterios de confirmación dentro de las colonias sospechosas A que se someten a confirmación.

C : es el número total de colonias sospechosas contadas en cada placa.

El resultado calculado se aproxima al número entero más próximo. Cuando se realiza esta operación, si la primera cifra decimal es igual o inferior a 5, no se modifica la cifra anterior; si la primera cifra decimal es igual o superior a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad (RENALOA, 2013).

El número de microorganismos N presentes en la muestra de análisis se calcula reemplazando $\sum C$ por $\sum a$ en la ecuación general

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1.1 \times d} \text{ quedando } \frac{\sum a}{V \times 1.1 \times d}$$

Donde:

V : es el volumen de inóculo utilizado en cada placa, en mililitros

d : es la dilución correspondiente a la primera dilución elegida
($d=1$ cuando se utiliza el producto líquido sin diluir)

El resultado calculado se redondea a dos cifras significativas. Cuando se realiza esta operación, si la tercera cifra es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior; si la tercera cifra es igual o superior a 5, la cifra anterior se incrementa una unidad. Preferiblemente el resultado se expresa como un número entre 1.0 y 9.9 multiplicando por la potencia de 10 adecuada, o como un número entero con dos

cifras significativas. El resultado se expresa como número de microorganismos N por gramo (RENALOA, 2013).

3. Método de cálculo para recuento bajo

Si la placa contiene menos de 15 colonias (de acuerdo a la norma específica ISO 7932 para el recuento de *B. cereus* en placa), pero como mínimo 4, el resultado se calcula como lo indicado en 2.3 y se expresa como un número estimado de microorganismos por gramo (RENALOA, 2013).

Si el resultado total oscila entre 1 y 3 colonias, la precisión del análisis es demasiado baja y el resultado debe expresarse como: “hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a $(4 \times d)$ por gramo (RENALOA, 2013).

VII. RESULTADOS

En el presente estudio se realizó la identificación y cuantificación de *B. cereus* en 81 muestras de arroz frito de tres variantes (pollo, lomito y mixto), recolectadas en nueve restaurantes de la zona 1 de la ciudad capital, reconocidos por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Se realizaron tres muestreos en un tiempo de tres meses con un intervalo de 15 días entre cada muestreo.

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos (LAFYM), utilizando el método de recuento en placa. Se llevó a cabo el control de calidad empleando la cepa ATCC 4342. Se realizaron las pruebas de confirmación para *B. cereus* según el Bacteriological Analytical Manual (2012).

Los resultados obtenidos de la cuantificación de *B. cereus* en los tres muestreos se resumen en el cuadro 1. De las 81 muestras analizadas, se aisló *B. cereus* en el 8.64% (8 de 81 muestras), obteniendo un recuento de 6.0×10^4 UFC/g. En el 91.36% de las muestras no se aisló *B. cereus* (73 de 81 muestras), se obtuvo un recuento constante menor a 10 UFC/g.

Cuadro 1: Cuantificación de *Bacillus cereus* en muestras de arroz frito de 9 restaurantes de comida china de la zona 1 de la Ciudad Capital de Guatemala (n=81)

Tipo de arroz	Muestreo I			Muestreo II			Muestreo III		
	n=27			n=27			n=27		
No. Restaurante	P	L	M	P	L	M	P	L	M
	UFC/g*			UFC/g			UFC/g		
R1	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
R2	6.0x10 ⁴	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
R3	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
R4	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
R5	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
R6	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
R7	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
R8	6.0x10 ⁴	6.0x10 ⁴	6.0x10 ⁴	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
R9	6.0x10 ⁴	6.0x10 ⁴	6.0x10 ⁴	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos (LAFYM) 2015.

* UFC/g=Unidades formadoras de colonias por gramo de alimento

** < 10 = Ausencia de *Bacillus cereus*

*** P= Pollo; L=Lomito; M=Mixto

En el cuadro 2 se muestra la clasificación de las muestras de arroz como aptas y no aptas para consumo humano, según la norma del *Codex alimentarius* para *B. cereus*, en cada variante de arroz (pollo, lomito y mixto). Las muestras que se consideraron como aptas para el consumo humano fueron 74 muestras, las cuales pertenecen a los restaurantes R1, R3, R4, R5, R6 y R7. Se identificaron 7 muestras de arroz frito no aptas para consumo humano, estas pertenecen a los restaurantes R2 (variante de pollo), R8 y R9 (tres variantes).

Cuadro 2: Clasificación de las muestras de arroz frito como aptas y no aptas por tipo de arroz según la norma del *Codex alimentarius*

Restaurante	Tipo de arroz	Clasificación		
		Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III
R1	P	A*	A	A
	L	A	A	A
	M	A	A	A
R2	P	NA**	A	A
	L	A	A	A
	M	A	A	A
R3	P	A	A	A
	L	A	A	A
	M	A	A	A
R4	P	A	A	A
	L	A	A	A
	M	A	A	A
R5	P	A	A	A
	L	A	A	A
	M	A	A	A
R6	P	A	A	A
	L	A	A	A
	M	A	A	A
R7	P	A	A	A
	L	A	A	A
	M	A	A	A
R8	P	NA	A	A
	L	NA	A	A
	M	NA	A	A
R9	P	NA	A	A
	L	NA	A	A
	M	NA	A	A

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Análisis Fisicoquímicos y Microbiológicos (LAFYM) 2015.

* A= Apto para consumo humano < 10 UFC/g = Ausencia de *Bacillus cereus*

** NA= No apto para consumo humano mayor a 1×10^4 UFC/g

*** P= Pollo; L=Lomito; M=Mixto

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con el fin de aislar *B. cereus*, se adquirieron muestras de arroz frito recolectadas en nueve restaurantes de la zona 1 de la ciudad capital de Guatemala, avalados por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Por medio de un muestreo seriado a cada restaurante, para obtener un total de 81 muestras de arroz frito con las variedades de lomito, pollo y mixto. Se seleccionaron estas tres diferentes variables de arroz, porque son las más populares en el consumo de este alimento.

Con el método de análisis microbiológico manejado por el Bacteriological Analytical Manual, (2012), se demostró que 7 de 81 (8.64%) muestras analizadas tenían crecimiento positivo, ya que reunían las características de lecitinasa positiva, catalasa positiva, bacilos gram positivo con espora central, beta hemólisis, crecimiento de colonias tipo galaxia, reducción de nitratos y crecimiento comparado al de la cepa control ATCC 4342.

El recuento obtenido del microorganismo fue 6.0×10^4 (cuadro 1), la norma del *Codex Alimentarius* establece que el criterio de aceptación para *B. cereus* en cereales, en donde está incluido el arroz, es de 1.0×10^3 a 1.0×10^4 UFC/g. Por lo tanto, los recuentos obtenidos superan el límite de aceptación para *B. cereus*. Se considera que existió la probabilidad de producir una intoxicación alimentaria en las personas que consumieron el alimento.

En el cuadro 2 se muestra las variantes de arroz y la clasificación como aptas y no aptas para consumo humano, según lo permitido por el *Codex Alimentarius*. En este cuadro se observa que en el primer muestreo 7 (8.64%) muestras no fueron aptas para consumo humano, dichas muestras pertenecen a los restaurantes R2 (variante de pollo), R8 (tres variantes), y R9 (tres variantes). Las otras 74 (91.36%) muestras analizadas se clasificaron como aptas para consumo humano, por lo que estas muestras no representaron un peligro para la salud de las personas que consumieron este alimento.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que *B. cereus* es un microorganismo poco frecuente de aislar en muestras de arroz frito en Guatemala. A pesar de ello, otros estudios

indican un resultado similar al presente estudio. Según Tejeda, Villagran, León y Tejeda en el año 2013, se aisló el 10% de *B. cereus* en muestras de arroz cocido en la ciudad de Puebla, México. Sin embargo, el porcentaje de aislamientos positivos puede representar un riesgo para la salud de las personas, si el alimento es preparado en condiciones inadecuadas y es consumido podría desarrollarse en el las toxinas que provocan el síndrome emético y diarreico.

Algunos estudios realizados en 2012 indican resultados similares de aislamiento de *B. cereus* en arroz comparados a la presente investigación, dentro de los cuales se pueden mencionar: Gamboa realizó un estudio en San José, Costa Rica, donde se detectó al microorganismo en arroz blanco cocido expandido en el área metropolitana, se aisló el 10% de *B. cereus* en 50 muestras de arroz. En otro estudio realizado en Cuba, se aisló el 20.4% en platos de arroz y natilla (Martino, et al, 2010). Los resultados de estas investigaciones indican que el porcentaje de aislamiento de *B. cereus* en alimentos como el arroz, es bajo. Comparando estos con la presente investigación también se obtuvieron resultados similares.

El crecimiento de *B. cereus* en las muestras obtenidas podría explicarse por el tiempo transcurrido desde la cocción, la resistencia de la endoespora de la bacteria a la cocción, lo cual pudo restablecer la población bacteriana. La ventaja ecológica de esta bacteria respecto a otras se debe a la diversidad de enzimas hidrolíticas extracelulares que presentan, entre las que se encuentran la amilasa, que es importante en este sustrato rico en almidón, la cocción de grandes cantidades de arroz, almacenaje a temperatura inadecuada y las condiciones imperantes del clima templado de la ciudad capital de Guatemala que favorecen una resistencia inusual al calor y a la radiación (Pérez, 2011).

La presencia de *B. cereus* en las muestras de arroz frito analizadas, podría ser un indicativo de que el arroz se mantuvo a temperatura ambiente ($>10^{\circ}\text{C}$) por más de cuatro horas después de cocción, lo cual favorece la germinación de la espora y el crecimiento vegetativo de *B. cereus* hasta niveles peligrosos. En esta etapa es cuando se producen las enzimas responsables de los síndromes diarreico y emético. El rápido recalentamiento antes del consumo no inactiva la enzima responsable del síndrome emético, si está presente, ya

que es termoestable y puede que no reduzca el número de bacterias por debajo de la dosis infectiva necesaria para causar el síndrome diarreico (Pérez, 2011).

Los restaurantes R1, R3, R4, R5, R6 y R7 obtuvieron un recuento <10 UFC/g por lo que se consideraron aptas para consumo humano según el *Codex Alimentarius* para *B. cereus*. En estas muestras se aislaron bacterias lecitinasa negativas, por lo cual no fueron consideradas como colonias pertenecientes al género de *B. cereus*. Según *Bacteriological Analytical Manual*, (2012), los *Bacillus* lecitinasa negativo no son patógenos al ser humano.

La ausencia de *B. cereus* en las muestras analizadas pudo deberse, a lo siguiente: que el arroz frito se mantuvo a una temperatura por encima de 55⁰C, la preparación del arroz se hiciera en pequeñas cantidades, las materias primas se almacenaran en refrigeración 2-8⁰C. y que se evitara el almacenamiento a temperatura ambiente por periodos superiores a dos horas. Por lo que posiblemente los restaurantes en mención realizaron buenas prácticas de manufactura y un control de calidad en cada proceso de cocimiento y preparación del arroz (UERIA, 2011).

Entre las posibles causas por las que en el primer muestreo se obtuvieron 7 muestras positivas para la presencia de *B. cereus* y en los posteriores muestreos no se aisló al microorganismo es que hubiera un cambio en el proveedor de arroz en los restaurantes o que se haya hecho un cambio en el personal que efectuaran mejores prácticas de manufactura e higiene. El arroz frito es un alimento que conlleva una doble preparación y cocción, en primer lugar es cocido y luego es freído a alta temperatura, con adición de otros comestibles como carnes, pollo, etc. Esto también pudo favorecer la ausencia de las células vegetativas en el arroz y por lo tanto no se pudo aislar el microorganismo.

Otra causa por la cual se aisló a *B. cereus* en el primer muestreo y en los posteriores muestreos no se identificó, pudo deberse a un cambio en el personal que preparó el alimento y esto llevó a que en los siguientes muestreos no hubiera una contaminación del arroz, o de los ingredientes agregados en la preparación del alimento. Como también que el arroz utilizado en el primer muestreo a los restaurantes, haya sido preparado el día anterior, y por ese motivo fue vulnerable a su contaminación por la bacteria mencionada.

Dentro de las limitantes del estudio se puede mencionar que el muestreo solamente se hizo en la zona 1 de la ciudad capital y ello limita a hacer generalizaciones respecto a la epidemiología de *B. cereus* en la ciudad de Guatemala.

IX. CONCLUSIONES

1. En el 91.36% de las muestras analizadas se obtuvo un recuento menor a 10 UCF/g por lo que estas fueron consideradas aptas para el consumo humano, según el *Codex alimentarius*.
2. El 8.64% de las muestras de arroz frito analizadas en los restaurantes de la zona 1 de la ciudad capital, fueron positivas para la presencia de *Bacillus cereus*.
3. El recuento obtenido de *B. cereus* en las muestras positivas, pertenecientes a los restaurantes R2, R8 y R9 fue superior al límite aceptado por el *Codex alimentarius*, por lo que se consideraron no aptas para el consumo humano.
4. En los restaurantes R1, R3, R4, R5, R6 y R7 se obtuvo un recuento constante menor de 10 UFC/g, por lo que el arroz preparado por estos fue considerado apto para consumo humano.

X. RECOMENDACIONES

1. Se sugiere seguir un estudio en el cual el diseño estadístico abarque una población mayor para obtener resultados que permitan hacer inferencias a nivel de toda la ciudad capital.
2. Realizar investigaciones que incluyan otros microorganismos como *E. coli*, *Salmonella* sp, en arroz frito debido a que *B. cereus* es un indicador de otros posibles agentes patógenos.
3. Estudiar la presencia de *B. cereus* en arroz y la identificación de las toxinas emética y diarreica.

XI. REFERENCIAS

- Acsa brief, (2011). Riesgos emergentes. Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. Departament de Salut. Recuperado de: www.gencat.cat/salut/acsa.
- Bartram, J. (2003). Heterotrophic plate counts and drinking-water safety: the significance of HPCs for water quality and human health. *Emerging Issues in Water and Infectious Disease*. Londres, Reino Unido. IWA Publishing.
- Blanco, A. (2009). Análisis de los grandes problemas predominantes de Salud Pública Vigilancia Sanitaria de los Alimentos en Costa Rica. Costa Rica.
- Arias, M. Blanco, W. Chaves, C. Pérez, C. y Rodríguez, C. (2009). Detección de *Bacillus cereus* toxigénicos en productos lácteos con especias y leches deshidratadas colectadas en Costa Rica. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Costa Rica.
- Burgos, G. Urquijo, L. Echeverri, R. Lodoño, B. Gamboa, J. y Salamanca, M. (2011). Perfil de Riesgo de *Bacillus cereus* en alimentos listos para consumo no industrializados. Ministerio de la Protección Social. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC), (2004). Food Disease outbreak Line listing. Atlanta, EE.UU. Recuperado de: <http://www.cdc.gov/foodborne-outbreaks/>.
- Chavarrías, M. (2012). *Bacillus cereus* y arroz, Seguridad alimentaria. Revista Ciencia y Tecnología de los alimentos. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Argentina.
- Coto, R. Chaves, C. Gamboa, M. y Arias, M. (2012). Calidad bacteriológica y detección de *Bacillus cereus* toxigénicos en arroz blanco cocido expandido en el área metropolitana de la provincia de San José, Costa Rica. Facultad de Microbiología, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica. Costa Rica.

- David, A. (2003). Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Dierick, K. Van Coillie, E. Swiecicka, I. Meyfroid, G. Devlieger, H. & Meulemans, A, (2005). Fatal family outbreak of *Bacillus cereus* associated food poisoning. Journal Clinical Microbiological. 43(1), 4277-4279.
- Duce, J. y Bordenave, S. (2012). Investigación sobre la presencia de *Bacillus cereus* en *Yerba Mate*. Revista Ciencia Tecnología. 14(17), 5-8. Argentina.
- Gamarro, R. (en prensa). Consumo de arroz crece 10% en el país. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. DANE. Fecha de publicación: 24 de mayo del 2011.
- Instituto Valenciano de Microbiología (s.f). *Bacillus subtilis*. Investigación y Recuento Recuperado de http://www.ivami.com/noticia_indiv.php?id_noticia=3511&opc=5&id=21&lang=es.
- Organización Panamericana de Salud/Organización Mundial de Salud. (OMS/OPS). (2010). Vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos. Recuperado de: <http://intranet.inppaz.org.ar/nhp/ve/ehome.asp>.
- Laboratorios Britania. (2010). *Bacillus cereus*. Selectivo Agar (según Mossel). Recuperado de http://www.britanialab.com/productos/425_hoja_tecnica_es.pdf.
- Lund, T. De Buyser, M. & Granum, P. (2000). A new enterotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Molecular Microbiology Journal. 38, 254-261.
- Mahler, H. Pasi, A. & Kramer, J. (1997). Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. New England Journal Medical. 336, 1031-1035.

- Martínez, J. (2008). Desarrollo de Métodos Rápidos para el control del *Bacillus cereus* en alimentos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Servicio de Publicaciones de Universidad de Valencia. España.
- Martino, T. Leyva V. Puig Y. Machin M. Aportela N. y Ferrer Y. (2010). *Bacillus cereus* y su implicación en la inocuidad de los alimentos. Parte I. Revista Cubana Salud Pública. La Habana, Cuba. 36(1). Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662010000100013.
- Martino, T. Leyva, V. Puig, Y. Hernández, I. Díaz, T. Reyes, M. y Camejo, A. (2010). *Bacillus cereus* y su implicación en la inocuidad de los alimentos. Parte II. Revista Cubana de Salud Publica. Ciudad de la Habana, Cuba. 36(1). Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S086434662010000100014&script=sci_arttext&lng=pt.
- Olea, A. y Díaz, J. (2012). Vigilancia de Brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Chile. Revista Chilena Infectología. 29(5), 504-510.
- Organización Mundial de la Salud/Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (1968). Aspectos Microbiológicos de la Higiene de los Alimentos. Serie de informes Técnicos No. 399. Ginebra.
- Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. (2006). Enfermedades causadas por alimentos. Recuperado de: www.panalimentos.org/panalimentos/educacion/education.asp?id=67. 2006. 38p. (p. 1-38).
- Padilla, J. (2007). Validación Secundaria del Método de Recuento en Placa en Superficie de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos en un laboratorio de referencia. Tesis Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
- Paulo, E. (2005). Manual de Disciplina. Microbiología de los Alimentos. Brasil.

- Pascual, M. y Calderón, V. (2000). *Microbiología Alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. 2ª Ed. Díaz de Santos: Madrid, España.
- Pérez, I. (2012). *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias. *Revista Cubana de Salud Pública*. Santiago de Cuba. 38(1), 98-108.
- Ramírez, W. (2012). *Propuesta de un manual de técnicas microbiológicas para los diferentes grupos alimenticios, referenciados en las metodologías normalizadas de la administración de drogas y alimentos (FDA)*. Tesis para optar al grado de Licenciatura en Química y Farmacia, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador.
- Red Nacional de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos (RENALOA). (2013). *Análisis Microbiológico de los Alimentos. Metodología analítica oficial. Microorganismos Patógenos*. Vol. 2. Argentina.
- Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2013). *Comentario Epidemiológico de las Enfermedades de declaración obligatoria y Sistema de Información Microbiológica*. Servicio de Vigilancia Epidemiológica. Instituto de Salud Carlos III. Recuperado de: <http://revista.isciii.es/bes/article/viewFile/826/954>.
- Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2003). *Brotos de Enfermedades Transmitidas por alimentos*. Centro Nacional de Epidemiología. España. Recuperado de: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientificotecnicos/fdvigilancias alertas/fdbrotos/Informedebrotosalimentarios.pdf>.
- Reglamento Técnico Centroamericano de Alimentos (RTCA). (2008). *Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos*. RTCA 67.04.50:08. Anexo de resolución No. 243-2009.
- Reyes, G. (2008). *Análisis de la Evolución de los Precios de Maíz, Arroz y Trigo y de sus productos derivados en Guatemala. Un estudio de los Impactos de los Precios en el consumo de estos cereales en la Coyuntura actual*. USAC. Dirección General de Investigación.

Reglamento Sanitario de los Alimentos Decreto N° 977/96. (1997). Publicado en el Diario Oficial de 13.05.97. Santiago de Chile, Chile.

Silva, I. (2011). Determinación y Cuantificación de *Bacillus cereus* en arroz cocido en las cafeterías de los centros regionales de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Sinisa, P. Moira, B. Ivo, P. Danja, L. Mladen, S. & Darko, R. (2005). An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. Institute of Public Health of Split and, Dalmatia County, Split, CROATIE (2) Health Protection Agency Central Public Health Laboratory, Food Safety Microbiology Laboratory, London.

Schneider, S. (2005). Estudio de caso: Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Guatemala, Consultor FAO, Guatemala.

Tallent, S. Rhodehamenl, J. Harmon & S. Bennett, R. (2012). Bacteriological Analytical Manual (BAM). Recuperado de: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070875.htm>.

Tejeda, F. Villagrán, C. León, G. y Tejeda, M. (2013). Investigación de *B. cereus* y calidad sanitaria de muestras de arroz cocido recolectadas en diferentes establecimientos de la ciudad de Puebla, México. Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Vandevenne, C. y Escolá, M. (2002). Método de Análisis Microbiológicos de los Alimentos. Díaz de Santos: Madrid, España.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Límites de crecimiento de *B. cereus* y sus características de crecimiento y supervivencia

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura	4	30-40	55
pH	5.0*	6,0-7,0	8,8
Aw	0.93	-----	

*Puede ser más bajo.

Fuente: (Pascual y Calderón, 2000)

Anexo 2: Características diferenciales de Especies Grupo I *Bacillus*

Característica	<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. mycooides</i>	<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. megaterium</i>
Reacción gran	+ ^(A)	+	+	+	+	+
La catalasa	+	+	+	+	+	+
Motilidad	+/- ^(B)	+/-	- ^(C)	+	-	+/-
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+	- ^(D)
Tirosina	+	+	+/-	+	- ^(D)	+/-
Resistencia a lisozima	+	+	+	+	+	-
Reacción Yema de huevo	+	+	+	+	+	-
Utilización anaeróbica de la glucosa	+	+	+	+	+	-
Reacción VP	+	+	+	+	+	-
Ácido producido a partir de manitol	-	-	-	-	-	+
La hemólisis (RBC ovejas)	+	+	+	ND	- ^(D)	-
Conocido patogenicidad e / Característica	produce enterotoxinas	crisales de endotoxinas patógenos para los insectos	crecimiento rizoidal	crecimiento a 6 ° C; hay crecimiento a 43 ° C	patógenos para los animales y los seres humanos	

^a +, 90-100% de las cepas son positivas.

^b +/-, 50-50% de las cepas son positivas.

^c -, 90-100% de las cepas son negativas.



^d -, La mayoría de las cepas son negativos.

^e Limitaciones del método para la *B. cereus*.

ND no determinado

(Bacteriological Analytical Manual, 2012)

Anexo 3: 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

Fuente: (Normativa *Codex alimentarius*, 2002), (Silva, 2011)