

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Pasantía en el Departamento de Higiene de la Leche del Instituto
de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de
Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania**

Modalidad: Pasantía

**Trabajo final de graduación para optar por el grado académico
Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Lucía Alvarenga Castro

**Campus Pbro. Benjamín Núñez, Heredia
2025**

TRIBUNAL EVALUADOR

Dra Laura Bouza Mora

Decana

Facultad de Ciencias de la Salud

Dra Julia Rodríguez Barahona

Directora

Escuela de Medicina Veterinaria

Dra Lohendy Muñoz Vargas

Asesora

Escuela de Medicina Veterinaria

Firma de la persona que preside la defensa: _____

Fecha: _____

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, mi pilar y mi mayor inspiración. Gracias por tu sabiduría infinita, por tu fortaleza inquebrantable y por ese amor tan inmenso que ha sido refugio y motor en cada paso de mi vida. Tu guía constante ha sido una luz que me ha sostenido en los momentos difíciles y me ha impulsado a seguir adelante cuando sentía que no podía más. Este logro también es tuyo.

A mi familia, gracias por su amor incondicional, por creer en mí incluso cuando yo dudaba, y por estar presentes en cada etapa de este camino.

A mis amigos de la Universidad, gracias por ser mi tribu en esta etapa tan transformadora. Con ustedes, las madrugadas de estudio se volvieron más llevaderas, y las victorias, por pequeñas que fueran, se celebraron como grandes triunfos. Sin su amistad, este viaje no habría sido igual de enriquecedor, divertido y lleno de aventuras. Los amo, estoy muy orgullosa de los colegas que tengo, llevaré siempre en mi corazón todo lo vivido juntos.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al equipo de TiHO por su valiosa guía y apoyo a lo largo de este proyecto. A Johana y Nadja, gracias por embarcarse en este camino conmigo y por su dedicación constante. A Sitka e Ina, por estar presentes en cada etapa del proceso. Y a mi querida amiga Lisa, gracias por tu apoyo incondicional y por estar siempre a mi lado en esta etapa tan importante.

A Lohendy Muñoz, quien ha sido mi tutora y mentora a lo largo de este proceso, gracias por acompañarme con paciencia, dedicación y esmero. Su guía ha sido fundamental para culminar esta etapa y dar cierre a mi formación profesional.

Finalmente quisiera externar mi agradecimiento a las entidades que financiaron este proyecto, las cuales son: ISAP-DAAD y la Universidad Nacional mediante los fondos de Ayuda de Movilidad Estudiantil del Departamento de Bienestar Estudiantil de la Vicerrectoría de Vida Estudiantil.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.1.1. La leche como matriz alimentaria	1
1.1.2. Producción y consumo nacional de lácteos.....	3
1.1.3. Enfermedades de transmisión alimentaria por consumo de lácteos y derivados.....	4
1.1.4. Enfermedades de Transmisión Alimentaria por consumo de lácteos y derivados en Costa Rica	6
1.1.4.1. Brucelosis	7
1.1.4.2. Listeriosis	8
1.1.4.3. Salmonellosis	8
1.1.4.4. Campylobacteriosis	9
1.1.4.5. Infección por <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.2. Justificación.....	12
1.3. Objetivos	13
1.3.1 Objetivo general	13
1.3.2 Objetivos específicos.....	13
2. METODOLOGÍA	15
2.1 Lugar de realización de la pasantía	15
2.2 Período de ejecución	15
2.3 Protocolos abordados	15
2.3.1 Método oficial L 00.00-88. Método horizontal para el recuento de microorganismos, método de recuento de colonias a 30°C.....	16

2.3.2 L 00.00-133/2: Método horizontal para la detección y enumeración de <i>Enterobacteriaceae</i> en lácteos	17
2.3.3 Método de recuento de colonias a 44 °C con 5-bromo-4-cloro-3-Indol-beta-D-glucurónido ..	17
2.3.4 L 00.00-20: Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de <i>Salmonella</i> ..	18
2.3.5 L 00.00-32/1: Método horizontal para la detección y enumeración de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria spp</i>	18
2.3.6 Sustituir palabra Test por Prueba de Yogurt	18
2.3.7 Test de queso	19
2.4 Pruebas ejecutadas.....	19
2.4.1 Prueba de detección de catalasa	19
2.4.2 Prueba de detección de oxidasa.....	20
2.4.3 Prueba de detección de <i>Escherichia coli</i>	20
2.4.4 Prueba cuantitativas de <i>Listeria</i>	20
2.4.5 Cultivo en agar VRGB	21
2.4.6 Prueba Staphylasa	21
2.4.7 Prueba de coagulasa en tubo	22
2.4.8 Prueba de coagulasa en portaobjetos.....	22
2.4.9 Prueba de coagulasa de cultivo en Chromoagar.....	22
2.5 Detección de trazas de antibióticos en las muestras.....	23
2.6 Coordinación de las visitas de campo	23
3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	25
3.1 Distribución horaria de pasantías	25
3.2 Distribución de muestras analizadas y principales pruebas realizadas	26
3.3 Muestras de leches recibidas para determinación de presencia de mastitis	27
3.4 Muestras de lácteos para determinación cualitativa de <i>Listeria</i>	28
3.5 Pruebas en agar VRGB para determinación de enterobacterias.....	28
3.6 Pruebas en agar TBX para determinación de enterobacterias	30
3.7 Pruebas para determinación de <i>Salmonella</i>	30
3.8 Pruebas cuantitativas para <i>Listeria</i>	31
3.9 Detección de trazas de antibióticos en muestreos lácteos	32
3.10 Actividades de campo	32
4. CONCLUSIONES	35

5. RECOMENDACIONES	36
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	37
7. ANEXOS.....	43
Anexo 1: Determinación del recuento bacteriano en queso vegano y yogurt vegano.....	43
Anexo 2: L 00.00-133/2: Método horizontal para la detección y enumeración de <i>Enterobacteriaceae</i> en la comida	45
Anexo 3: <i>Escherichia coli</i> β -glucuronidasa positiva en la comida	47
Anexo 4. L 00.00-20: Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de <i>Salmonella</i> 49	
Anexo 5: L 00.00-32/1: Método horizontal para la detección y enumeración de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria spp.</i>	51
Anexo 6: Prueba de desafío del yogurt	55
Anexo 7: Prueba de desafío del queso	61
Anexo 8. Bitácora de Trabajo Firmada	67
Anexo 9. Certificado del Instituto de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania	85

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Protocolos de análisis laboratoriales en lácteos, y normas base aplicadas durante la pasantía en el Departamento de Higiene de la Leche del Instituto de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania	16
Cuadro 2. Distribución total de muestras analizadas durante proceso de pasantías en el Departamento de Higiene de la Leche del Instituto de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania	26
Cuadro 3. Pruebas cualitativas mediante cultivos en caldos específicos para <i>Listeria</i> caldo Frasser y Half frasser y posterior cultivo en placas de agar de <i>Listeria</i> brilliance y placas de Palcam.....	28
Cuadro 4. Determinación total de presencia de enterobacterias mediante cultivo en agar VRGB.....	29
Cuadro 5. Cultivo de muestras en agar TBX para determinación de presencia de <i>E. coli</i>	30
Cuadro 6. Pruebas para determinación de presencia de <i>Salmonella</i> mediante cultivos de RVS caldo y MKTT caldo y cultivos en <i>Salmonella</i> brilliance agar y XLD agar	30
Cuadro 7. Pruebas cuantitativas de <i>Listeria</i>	31
Cuadro 8. Distribución de horas específicas en lechería realizadas en el Departamento de Higiene de la Leche del Instituto de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania durante la pasantía realizada en Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania,	33

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura

CDC: Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América

CNPL: Cámara Nacional de Productores de Leche de Costa Rica

ETA: Enfermedades de Transmisión Alimentaria

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

HACCP: Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control

PCC: Puntos Críticos de Control

SURDRY: Surdry Food Sterilizers

TBX: Triptona Bilis x-Glucurónido

TFG: Trabajo Final de Graduación

UHT: Tratamiento a altas temperaturas

RESUMEN

Este Trabajo Final de Graduación presenta los resultados de la pasantía realizada en el Departamento de Higiene de la Leche del Instituto de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania, que se llevó a cabo del 1° de febrero al 31 de mayo de 2024, incluyendo un total de 598 horas. La pasantía se centró en la capacitación sobre pruebas laboratoriales de calidad e inocuidad de lácteos, y en visitas a campo coordinadas para la evaluación de buenas prácticas aplicadas a instalaciones pecuarias y plantas de proceso; así como para la toma de muestras para su análisis en laboratorio. Los principales ensayos para evaluar la calidad de la leche y derivados lácteos incluyeron: la prueba de detección de catalasa (n=83), la prueba de detección de oxidasa (n=83), la prueba de detección de *Escherichia coli* (n=83), la prueba cualitativa de *Listeria monocytogenes* (n=62), la prueba cuantitativa de *Listeria monocytogenes* (n=30), la prueba *Staphylasa* (n=32), y la prueba de coagulasa de cultivo en Chromoagar para *Escherichia coli* (n=32). En total se participó en el análisis de 113 muestras provenientes de bovinos, 51 de leche cruda, 37 de yogurt, y 25 pruebas en muestras de queso. La patología más relevante asociada con la calidad de la leche estudiada fue la mastitis, con 32 pruebas específicas dedicadas a esta patología. De igual forma, se realizaron visitas a campo tanto a fincas de producción como a plantas de procesamiento de lácteos. Toda la experiencia adquirida en el proceso de la pasantía sirvió para resaltar la importancia de ejecutar correctos procesos de análisis de la calidad de la leche y sus derivados, así como para entender que los muestreos lácteos son fundamentales para salvaguardar la salud pública, ya que favorecen la detección de organismos patógenos transmitidos a través de su consumo. Una detección microbiológica temprana ayuda a prevenir brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y a garantizar la salud alimentaria de la población.

Palabras clave: inocuidad alimentaria, lácteos, consumo humano, quesos, yogurt

ABSTRACT

This final graduation project presents the results of the internship conducted at the Department of Milk Hygiene at the Institute for Food Quality and Safety of the University of Veterinary Medicine (TiHo), Hannover, Germany, which took place from February 1st to May 31st, 2024, and included a total of 598 hours. The internship focused on training in laboratory testing for dairy quality and safety, and on coordinated field visits to evaluate good practices applied to livestock facilities and processing plants, as well as sample collection for laboratory analysis. The main assays for evaluating the quality of milk and dairy products included: catalase detection test (n=83), oxidase detection test (n=83), *Escherichia coli* detection test (n=83), qualitative *Listeria monocytogenes* test (n=62), quantitative *Listeria monocytogenes* test (n=30), Staphylase test (n=32), and Chromoagar culture coagulase test for *Escherichia coli* (n=32). A total of 113 samples from cattle, 51 from raw milk, 37 from yogurt, and 25 tests on cheese samples were analyzed. The most significant disease associated with milk quality studied was mastitis, with 32 specific tests dedicated to this pathology. Field visits were also conducted to both production farms and dairy processing plants. The experience gained during the internship served to highlight the importance of correctly analyzing the quality of milk and its derivatives, as well as to understand that dairy sampling is essential for safeguarding public health, as it facilitates the detection of pathogens transmitted through consumption. Early microbiological detection helps prevent outbreaks of foodborne illnesses and ensure the nutritional safety of the population.

Keywords: food safety, dairy, human consumption, cheeses, yogurt

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. La leche como matriz alimentaria

De acuerdo con el *Codex Alimentarius*, “la leche es el producto de la secreción de la glándula mamaria obtenida a través del proceso de ordeño, y se destina al consumo humano en diferentes formas” (González, 2018). La leche tiene una alta densidad nutricional proporcionando carbohidratos simples como la lactosa, la cual actúa como la principal fuente de energía. Asimismo, incluye proteínas de alta calidad biológica, lípidos, vitaminas como la B₁₂ y minerales como el calcio, magnesio, selenio, riboflavina y ácido pantoténico (Salas et al., 2020; Fuentes et al., 2013), siendo un alimento indispensable para la salud global (Orús, 2024).

La leche se compone de dos fracciones principales: una porción líquida que contiene agua y una porción de sólidos que incluye principalmente grasa (3-4% del contenido sólido), proteína (3,5%) y lactosa (3-5%). Desde un punto de vista químico, la leche puede ser caracterizada como un líquido alimenticio que incluye grasa emulsionada y proteínas dispuestas en micelas. Por consiguiente, exhibe propiedades fisicoquímicas como densidad, pH, punto de congelación y punto de ebullición, que se emplean para evaluar y establecer su calidad (Peragio et al., 2011).

Su composición la convierte en un medio de cultivo ideal para el desarrollo de microorganismos que pueden ser patógenos para los seres humanos (Celis y Juárez, 2009). Entre estos patógenos se encuentran bacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., hongos como *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, y virus, como el norovirus y el rotavirus (Peragio et al., 2011); algunos de estos pueden ser de origen zoonótico, es decir, aquellos que se transmiten de animales a seres humanos, o adquiridos por contaminación con microorganismos ambientales durante las etapas de recolección y procesamiento de la leche por carencia de medidas de higiene y preservación del producto.

Dentro de los factores que afectan la composición de la leche se encuentran la raza del animal, la edad, el estado de lactancia, la disponibilidad nutricional, el entorno físico, el estrés y la estación del año (FAO, 2023). Todas estas condiciones o situaciones tanto fisiológicas como patológicas, influyen directamente sobre su calidad sanitaria y pueden ser la causa de

una contaminación del producto tanto primaria (proveniente del animal) como secundaria (proveniente de factores externos) (Peragio et al., 2011).

Cuando la leche es extraída de la ubre de una vaca sana, se espera que presente un bajo recuento bacteriano (100-1000 UFC/ ml). No obstante, durante el proceso de ordeño, es posible que agentes bacterianos sean introducidos si no se mantienen condiciones higiénicas apropiadas en la sala, el equipo, el personal y el entorno (Celis y Juárez, 2009). Durante el transporte, almacenamiento o procesamiento de la leche, la exposición a fuentes de contaminación puede incrementar significativamente los conteos microbiológicos, comprometiendo su calidad e inocuidad. Este incremento se ve favorecido, en particular, por condiciones inadecuadas de temperatura que estimulan el crecimiento de microorganismos (Periagio et al., 2012).

En el proceso de ordeño, es fundamental que la leche sea transferida a los tanques de enfriamiento. En este punto, es necesario que la temperatura inicial de la leche, que es de 37°C, sea reducida para alcanzar los 8°C o menos, en un plazo de 24 horas, para prevenir el crecimiento de bacterias (Peragio et al., 2012), en particular las mesófilas (Celis y Juárez, 2009). El control preciso de la temperatura es indispensable a lo largo de todas las etapas del procesamiento de la leche (Celis y Juárez, 2009).

Otro parámetro importante para evaluar la calidad de la leche es el conteo de células somáticas, el cual debe ser de aproximadamente 200 000 CS/ml. Los conteos superiores a 400 000 CS/ml evidencian una posible mastitis subclínica (Celis y Juárez, 2009) la cual se define como la inflamación del tejido mamario que puede ser de origen infeccioso, tóxico o traumático (Velásquez y Vega, 2012).

La mastitis, ya sea en su forma clínica o subclínica, ocasiona modificaciones en la composición de la leche que impactan en su calidad y disminuyen su concentración de proteínas. Una de las consecuencias observadas es la complicación en el proceso de coagulación y desuerado para la elaboración de productos, junto con la disminución en la vida útil de los mismos (Velásquez y Vega 2012).

Entre los agentes contaminantes que causan mastitis se han descrito principalmente los siguientes: *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* (Celis y Juárez, 2009). Estos patógenos presentes en vacas con mastitis pueden afectar la salud de los consumidores, especialmente si se consume sin pasteurizar. Entre las manifestaciones más comunes se encuentran la gastroenteritis, diarrea, vómito y calambres abdominales, causada por patógenos como

Escherichia coli y *Staphylococcus aureus*. Además, hay riesgo de infecciones más graves como la sepsis o infecciones respiratorias, especialmente por bacterias resistentes como *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*, que pueden afectar a personas con sistemas inmunológicos debilitados. También existe la posibilidad de contraer infecciones urinarias y cutáneas por otros patógenos presentes en la leche contaminada.

1.1.2. Producción y consumo nacional de lácteos

La leche se distingue de otras matrices alimentarias de origen animal por la estructura molecular de sus componentes. Los ácidos grasos presentes en los productos lácteos generan una emulsión que se mantiene estable en agua, lo que contribuye a mejorar su absorción (Aparicio et al., 2020). La fracción proteica, que comprende principalmente la caseína y en menor medida las proteínas del suero de la leche, contribuye a mejorar el perfil lipídico al aumentar la digestibilidad. En resumen, las interacciones entre los componentes lácteos convierten a esta matriz alimentaria en una opción ideal, ya que regula la funcionalidad y metabolización de los distintos nutrientes, lo que a su vez proporciona mayores beneficios en su conjunto, en contraste con la ingesta individual de cada nutriente (Aparicio et al., 2020).

La leche bovina representa alrededor del 81% de la producción lechera mundial, seguida por la leche bufalina (15%), la leche caprina (2%) y la leche ovina (0,5%) (FAO, 2023). A lo largo de las décadas, se ha observado un notable incremento en el consumo de productos lácteos. Un estudio reciente indica que la producción de leche en EE. UU., alcanzó su punto máximo en 2023, con 226.6 mil millones de libras, lo que representa un incremento significativo desde 1975 del 88,3 % (Departamento de Agricultura de Estados Unidos, 2024). Durante las últimas tres décadas, se ha observado un incremento mundial aproximado del 59% en la producción siendo que, en 1988, alcanzó 530 billones de toneladas, mientras que para el año 2018 se estimó en 843 billones de toneladas a nivel mundial (FAO, 2023).

La Unión Europea es responsable del 30% de la producción láctea de origen vacuno a nivel mundial seguido de la India, quien es responsable del 20%, Estados Unidos (12%), China (6 %) y Pakistán (5%) (FAO, 2023; Orús, 2024). En los últimos 50 años, la región de Asia meridional ha experimentado un notable crecimiento en el sector lácteo, posicionándose como el principal motor de desarrollo de la industria lechera en áreas en proceso de expansión.

Por otro lado, África ha mostrado el menor avance en este ámbito, atribuible a factores como la situación de pobreza y las condiciones climáticas adversas que caracterizan a la región (FAO, 2023). Un informe del Banco Mundial destaca cómo la producción de leche en

el continente africano está vinculada a sistemas de pequeña escala que constituyen la base de la seguridad alimentaria y los ingresos en muchas comunidades rurales. La producción ha aumentado en países como Etiopía, donde las iniciativas gubernamentales han impulsado la productividad mediante la mejora de prácticas ganaderas y la infraestructura de mercados. Aun así, la falta de acceso a tecnología moderna y los desafíos climáticos siguen siendo barreras significativas para el crecimiento sostenido del sector lácteo en África (Banco Mundial, 2011).

En Costa Rica, el incremento en la producción de lácteos ha estado acompañado por un aumento en la demanda interna, en línea con la tendencia global. Se estima que actualmente Costa Rica presenta un consumo que supera los 220 litros per cápita por año, siendo uno de los países con mayor consumo en América Latina (Delfino, 2025). En las últimas décadas, el país experimentó un crecimiento significativo en su producción nacional, alcanzando en el año 2001 una producción de 737 mil toneladas métricas (Barrientos, 2010), la cual aumentó a 892 mil toneladas métricas en 2009, y para el año 2016 llegó a 1.151 billones de litros (CNPL, 2017). Este crecimiento ha sido impulsado por una industria láctea en constante evolución, que se enfoca en el desarrollo de nuevos productos para satisfacer las demandas cambiantes de los consumidores.

Paralelamente, Costa Rica ha desarrollado un importante mercado de exportación de productos lácteos, principalmente en América Central. Entre los productos más exportados se encuentran la leche en polvo, quesos, mantequilla y productos lácteos frescos. La leche en polvo destaca por su alta demanda en mercados de Centroamérica y el Caribe, debido a su larga vida útil. Los quesos costarricenses, tanto frescos como madurados, también son populares en la región, mientras que la mantequilla y otros productos frescos son valorados por su calidad y frescura (Procomer, 2023). Aunque el mercado local está protegido por altos aranceles de importación, la industria ha logrado consolidarse como un actor relevante en el comercio regional (Katial, 2018).

1.1.3. Enfermedades de transmisión alimentaria por consumo de lácteos y derivados

El consumo de lácteos y sus derivados, si bien poseen beneficios nutricionales para el consumidor, podrían albergar microorganismos de riesgo para la salud pública, principalmente debido a carencias de buenas prácticas de higiene en el manejo de colecta y procesamiento de la leche y sus derivados. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América (CDC) reportó durante el período entre 1993

a 2012, un total de 127 brotes y 1909 enfermedades vinculadas con intoxicación por productos lácteos, de las cuales 144 requirieron hospitalizaciones. En Costa Rica se identificaron alrededor de 27 casos de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) durante el período de 2015 a 2020; sin embargo, no ha habido una estimación certera de cuantos corresponden exclusivamente a consumo de productos lácteos (Cartín-Rojas y Pascual Barrera, 2021).

Algunas de las bacterias mayormente reportadas como causantes de enfermedades alimentarias causadas por productos lácteos asociadas con síntomas como diarrea, vómito, dolor abdominal, dolor generalizado (CDC, 2020) incluyen: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Brucella abortus*, *Pseudomonas* spp., *Clostridium* spp, entre otros (Aguilera-Becerra et al., 2014).

Estos patógenos pueden contaminar los alimentos en etapas que van desde la producción hasta el procesamiento. Por ejemplo, pueden ingresar al suministro de leche a través del contacto directo con entornos contaminados, como granjas lecheras, o de animales reservorios. Si bien la pasteurización reduce significativamente el riesgo de estos patógenos, aún se han rastreado brotes tanto en productos lácteos crudos como pasteurizados de manera inadecuada, lo que resalta la importancia de mantener prácticas de higiene estrictas en toda la cadena de producción de lácteos para garantizar la inocuidad alimentaria (Grace et al., 2020).

Las implicaciones de las enfermedades transmitidas por los productos lácteos pueden ser graves, en particular para las poblaciones vulnerables, como los niños, las mujeres embarazadas y las personas con sistemas inmunológicos debilitados. La carga económica de estas enfermedades también es significativa, ya que contribuyen a los costes sanitarios y a la pérdida de productividad. Por ello, comprender y mitigar los riesgos asociados con el consumo de leche y productos lácteos es crucial para la salud pública (Oliver et al., 2005).

Con el fin de evitar dichos riesgos, la industria suele aplicar diversas técnicas de esterilización de la leche. Una de estas es la pasteurización la cual es un proceso donde se alcanzan temperaturas entre 72°-80° C durante 16-22 segundos antes de enfriarse rápidamente a una temperatura entre 4°-6° C con el fin de disminuir la carga bacteriana en un 98% (Guaraca y Guaraca, 2019). También existen métodos de esterilización comercial que usan temperaturas más elevadas en un tiempo corto como el método de tratamiento a altas temperaturas (UHT), mediante el cual se somete a la leche a una inyección de vapor a presión a 150°C durante un segundo (SURDRY, 2023). Estos cambios de temperatura permiten una disminución de microorganismos nocivos como los mencionados anteriormente y garantizan

parte de la inocuidad del producto lácteo para que sea apto para el consumo humano (Bennett, 2008).

Con el objetivo de procurar la salud pública de los consumidores de leche y sus subproductos, es necesario garantizar una buena calidad e inocuidad de esta. Para ello, resulta de vital importancia instaurar Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y un Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP). Las BPM se definen como un conjunto de principios básicos que buscan garantizar que los productos alimentarios se fabriquen en condiciones sanitarias adecuadas y se disminuyan los riesgos inherentes a la producción y distribución (OMS, 2023). Además, se requiere de condiciones de infraestructura y procedimientos establecidos para todos los procesos de producción con el objetivo de procurar la calidad e inocuidad, basadas en normas internacionales (RTCA, 2003).

Dentro de la gestión industrial se establecen sistemas como el HACCP para identificar, evaluar y controlar peligros significativos en la industria alimentaria (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 1997). Los principios del HACCP en la industria alimentaria incluyen siete puntos de importancia: 1) realizar un análisis de peligros, 2) determinar los puntos críticos de control, 3) establecer un límite o límites críticos, 4) establecer un sistema de vigilancia de control de los PCC, 5) establecer las medidas correctivas que han de adoptarse cuando la vigilancia indica que un determinado punto crítico no está controlado, 6) establecer procedimientos de comprobación para confirmar que el sistema HACCP funcione y 7) establecer un sistema de documentación sobre todos los procedimientos y registros apropiados para estos principios y su aplicación. Todos estos son de vital importancia para el aseguramiento de la calidad e inocuidad de los productos que salen al mercado para consumo.

1.1.4. Enfermedades de Transmisión Alimentaria por consumo de lácteos y derivados en Costa Rica

En Costa Rica, las ETA representan un problema significativo de salud pública, con estimaciones que indican que afectan a miles de personas cada año; por ejemplo, el Boletín Epidemiológico N° 49 reportó 463.484 casos acumulados en el año 2024 de enfermedad diarreica aguda (EDA) (Ministerio de Salud de Costa Rica, 2024).

Las ETA primarias causadas por *Salmonella* y *Escherichia coli*, así como *Listeria* spp., reportadas en Costa Rica, resultan en gastos significativos para el sistema de salud y para la economía del país. Estos gastos provienen de servicios de salud directos como

hospitalización y tratamiento ambulatorio, que oscilan entre 500 y 5,000 USD por caso, dependiendo de la gravedad. Además, la pérdida de productividad por ausentismo y cuidado puede costar entre 1,000 y 10,000 por caso. Además, los costos incurridos por medidas de control y prevención, como vigilancia epidemiológica, inspecciones y campañas de educación, pueden alcanzar millones cada año. Como lo expresa el Ministerio de Salud de Costa Rica, el monitoreo y la prevención de la ETA ha resultado en mejores métodos de producción de alimentos y prácticas de manipulación de alimentos para mitigar sus efectos (Ministerio De Salud, 2022).

A continuación, se describen algunas de las ETA más asociadas al consumo de lácteos contaminados con agentes patógenos diversos.

1.1.4.1. Brucelosis

La brucelosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Brucella*, que infectan principalmente al ganado vacuno, porcino, caprino, ovino y canino. Los seres humanos generalmente contraen la enfermedad a través del contacto directo con animales infectados, al comer o beber productos animales contaminados o al inhalar agentes transportados por el aire. La vía de transmisión más común es el consumo de leche o queso no pasteurizados de cabras u ovejas infectadas (Galeano et al., 2020).

La brucelosis se considera una enfermedad zoonótica, lo que significa que puede transmitirse de animales a seres humanos. Por lo general, causa síntomas similares a los de la gripe, como fiebre, debilidad, malestar y pérdida de peso, pero puede presentarse en muchas formas atípicas. El período de incubación puede variar ampliamente, desde una semana a dos meses, pero por lo general es de dos a cuatro semanas. Sin un tratamiento antibiótico adecuado, la brucelosis puede provocar complicaciones graves e infecciones crónicas (Álvarez-Hernández et al., 2015).

La incidencia de la brucelosis humana en Costa Rica es relativamente baja en comparación con otras partes del mundo, pero sigue siendo un problema de salud pública importante, especialmente en ciertas regiones del país. Entre 2015 y 2017, un estudio realizado en las Áreas de Salud de Aguas Zarcas y Los Chiles encontró que la brucelosis era la enfermedad zoonótica notificada con mayor frecuencia, con una tasa de incidencia de 1,5 casos por cada 100.000 habitantes (Galeano et al., 2020).

1.1.4.2. Listeriosis

La listeriosis es una infección grave causada principalmente por la bacteria *Listeria monocytogenes*, que se encuentra comúnmente en productos alimenticios contaminados en especial en leche y derivados lácteos. Esta enfermedad es particularmente preocupante debido a su capacidad de prosperar en ambientes fríos, como refrigeradores, lo que le permite multiplicarse en alimentos que se almacenan durante períodos prolongados. Las personas generalmente contraen listeriosis a través del consumo de alimentos contaminados, incluidos productos lácteos no pasteurizados, carnes listas para comer y ciertas verduras. Los síntomas pueden variar desde malestar gastrointestinal leve, como diarrea y fiebre, hasta manifestaciones más graves, como meningitis y septicemia, especialmente en grupos de alto riesgo, como mujeres embarazadas, ancianos y personas inmunodeprimidas (Hernández y Payeras, 2014).

La incidencia de listeriosis en Costa Rica no está bien documentada, principalmente porque la enfermedad no está clasificada como de declaración obligatoria, lo que limita la recopilación de datos epidemiológicos completos. Estudios recientes han indicado que los niveles de contaminación por *Listeria monocytogenes* en diversos productos alimenticios, en particular carnes procesadas y quesos frescos, varían entre el 5% y el 20% (Giralt-Zúñiga et al., 2023).

Las investigaciones realizadas entre 2009 y 2019 identificaron 92 aislamientos de *Listeria monocytogenes* en muestras clínicas, alimentarias y ambientales, lo que reveló que la mayoría de los casos humanos estaban relacionados con productos lácteos (Food Safety News, 2023). Sin embargo, la falta de notificación obligatoria dificulta la evaluación de la verdadera prevalencia y diversidad de las cepas de *Listeria* que circulan en el país, ya que muchas infecciones pueden no notificarse o diagnosticarse erróneamente debido a sistemas de vigilancia insuficientes.

1.1.4.3. Salmonellosis

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa causada por la bacteria del género *Salmonella*, que se encuentra comúnmente en los intestinos de animales y humanos. La infección se transmite principalmente a los humanos a través del consumo de alimentos contaminados, en particular carnes, aves, huevos y productos lácteos no pasteurizados poco cocidos o crudos, así como frutas y verduras contaminadas con materia fecal. Los síntomas suelen manifestarse entre seis horas y seis días después de la exposición y pueden incluir

diarrea, fiebre, calambres abdominales y vómitos, que duran entre cuatro y siete días. Si bien la mayoría de las personas se recuperan sin tratamiento, la salmonelosis puede provocar complicaciones graves, especialmente en poblaciones vulnerables, como niños pequeños, ancianos y personas con sistemas inmunológicos debilitados (Rojas-Sánchez et al., 2023).

La salmonelosis en Costa Rica es un problema de salud pública importante, aunque los datos exhaustivos sobre su prevalencia son limitados debido a la falta de notificación obligatoria. Los estudios indican que la salmonelosis es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más comunes en el país, a menudo vinculada con el consumo de aves de corral, huevos y productos lácteos contaminados. Un estudio realizado en 2020 reveló una prevalencia del 6% de *Salmonella* entérica en muestras fecales de ganado lechero posparto, lo que destaca el potencial de transmisión del ganado a los humanos a través del suministro de alimentos (Huertas Sánchez, 2020). Esto sugiere que las granjas lecheras podrían ser un punto de origen crítico para los casos de salmonelosis.

1.1.4.4. Campylobacteriosis

La campylobacteriosis en Costa Rica se asocia principalmente con el consumo de productos alimenticios contaminados, incluidos los lácteos. Si bien las aves de corral suelen ser señaladas como una fuente importante de infecciones por *Campylobacter*, la leche y los productos lácteos no pasteurizados también plantean riesgos importantes. La presencia de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en la leche cruda puede provocar brotes de enfermedades gastrointestinales, en particular entre poblaciones vulnerables como los niños y los ancianos (Davys et al., 2020). El consumo de productos lácteos no pasteurizados puede facilitar la transmisión de estas bacterias, ya que pueden sobrevivir y multiplicarse en dichos entornos, lo que provoca infecciones caracterizadas por diarrea, dolor abdominal y fiebre (Lazo-Láscarez et al., 2021).

La incidencia de la campylobacteriosis relacionada con los productos lácteos en Costa Rica no está ampliamente documentada, pero los estudios indican una prevalencia preocupante de *Campylobacter* en varias matrices alimentarias, incluidos los lácteos. Las investigaciones han demostrado que la prevalencia de *Campylobacter* en productos alimenticios, especialmente en aquellos de origen animal, es considerablemente alta. Un metaanálisis global indicó que la prevalencia promedio de *Campylobacter* spp. en productos alimenticios de origen animal es del 29,6%, siendo especialmente común en carnes de aves, que representan uno de los principales vehículos de transmisión para este patógeno. La alta

prevalencia de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en alimentos derivados de animales subraya la necesidad de implementar controles rigurosos en la producción y manipulación de alimentos para minimizar los riesgos de transmisión (Zenebe et al., 2020).

Dada la importancia cultural del consumo de productos lácteos en Costa Rica, en particular en las zonas rurales donde los productos no pasteurizados pueden ser más comunes, es necesario aumentar la conciencia pública y las medidas de seguridad alimentaria para mitigar los riesgos asociados con la campilobacteriosis de los productos lácteos (Cartín-Rojas y Pascual Barrera, 2021).

1.1.4.5. Diarreas por *Escherichia coli*

La enfermedad por *Escherichia coli* (*E. coli*), particularmente causada por cepas como *E. coli* O157:H7, es una importante enfermedad transmitida por alimentos vinculada con el consumo de productos lácteos. Esta cepa patógena se puede encontrar en la leche y los productos lácteos no pasteurizados, lo que supone un riesgo para la salud pública.

El consumo de productos contaminados se asocia con síntomas gastrointestinales graves, como diarrea (a menudo sanguinolenta), calambres abdominales y vómitos, y puede provocar complicaciones más graves como el síndrome urémico hemolítico (SHU), especialmente en poblaciones vulnerables como los niños y los ancianos (Ríos-Muñiz et al., 2019).

Las investigaciones han evidenciado que los productos alimenticios de origen animal, incluidos los lácteos, son susceptibles a la contaminación microbiana, siendo *E. coli* O157:H7 uno de los principales patógenos identificados en muestras de leche cruda de varias regiones de Costa Rica (Cartín-Rojas y Pascual Barrera, 2021). La presencia de *E. coli* O157:H7 tanto en la leche cruda como en otros productos animales evidencian prácticas de procesamiento y manipulación inadecuados y pone de relieve la necesidad de adoptar medidas estrictas de seguridad alimentaria, incluida la pasteurización y las prácticas de higiene adecuadas, para mitigar el riesgo de brotes.

1.1.4.6. Infección por *Staphylococcus aureus*

La intoxicación alimentaria estafilocócica es una de las ETA más comunes a nivel mundial, causada por el consumo de toxinas termoestables producidas por la bacteria *Staphylococcus aureus*. Esta bacteria puede contaminar alimentos de origen animal, especialmente leche y productos lácteos, debido a prácticas higiénicas inadecuadas durante el

ordeño, manipulación o procesamiento. La enterotoxina estafilocócica puede sobrevivir a tratamientos térmicos convencionales, como la pasteurización, lo que convierte a esta bacteria en una amenaza significativa para la seguridad alimentaria (Argudín et al., 2010).

Los síntomas de la intoxicación estafilocócica aparecen generalmente entre dos y seis horas después del consumo del alimento contaminado e incluyen náuseas, vómito, dolor abdominal y diarrea. Aunque los casos suelen ser autolimitados y de corta duración, pueden causar complicaciones graves en personas vulnerables como niños pequeños, adultos mayores y personas inmunocomprometidas (Le Loir, Baron y Gautier, 2003).

La prevención de la intoxicación por *S. aureus* en productos lácteos requiere una combinación de medidas de higiene en la producción primaria, buenas prácticas de manufactura, refrigeración adecuada y educación al consumidor sobre los riesgos del consumo de leche cruda y productos derivados no pasteurizados (Codex Alimentarius, 2020).

En líneas generales existen varias enfermedades zoonóticas que son de importancia para el estudio de la calidad de la leche y sus derivados. Sin embargo, es difícil conocer con certeza la incidencia real de las mismas debido a la falta de notificación y a las dificultades para su detección como la limitada disponibilidad de métodos rápidos y sensibles para su diagnóstico. El RTCA 67.03.12:2013. indica los criterios microbiológicos deseables para considerar un lácteo como inocuo, como por ejemplo los límites máximos permisibles de microorganismos patógenos, como *Escherichia coli* y *Staph aureus* o la permisibilidad de la presencia para *Salmonella spp.*, *Brucella* y *Mycobacterium tuberculosis*. Además, el RTCA 67.03.12:2013. establece los parámetros de higiene en el proceso de ordeño, el manejo adecuado de los animales y el almacenamiento, transporte y procesamiento de la leche para reducir el riesgo de contaminación. Debido a la trascendencia sanitaria, es fundamental la implementación de prácticas de control y monitoreo en todas las etapas de la cadena productiva, desde la granja hasta la industria láctea, para garantizar que los productos finales cumplan con los estándares de inocuidad y no representen un riesgo para la salud pública.

La efectividad de estos controles depende de la capacitación de los productores, la infraestructura sanitaria adecuada y la implementación de políticas públicas que fomenten la notificación y el monitoreo constante de enfermedades zoonóticas. En consecuencia, se hace necesaria una mejor vigilancia epidemiológica de las manifestaciones de estas zoonosis en humanos. Además, al haber tales deficiencias en el reporte de casos, se hace imprescindible la evaluación de la calidad de los alimentos lácteos antes de su disposición al consumo en el mercado costarricense.

1.2. Justificación

En el ámbito de la salud pública, es fundamental comprender el concepto de seguridad alimentaria. Esta disciplina científica se enfoca en asegurar la disponibilidad de alimentos para los consumidores, así como en garantizar su inocuidad. Por ende, se procura la disminución de los riesgos biológicos, físicos y químicos que puedan afectar la salud del consumidor, así como la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos que surgen de forma repetida (FAO, 2023).

Como muestra, la OMS estima que cada año se dan aproximadamente 600 millones de casos nuevos de enfermedades transmitidas por los alimentos; de los cuales aproximadamente 420 000 casos resultan en muertes (Kirk et al. 2015). En vista de que la necesidad alimenticia es la tercera necesidad humana más básica para sostener la vida, es de suma importancia poder garantizar la seguridad alimentaria, siendo un tema crucial dentro del área de salud pública (FAO, 2023).

La ciencia veterinaria es indispensable para garantizar la inocuidad alimentaria, en particular de los productos de origen animal. Los profesionales de la medicina veterinaria protegen la salud pública previniendo y controlando las enfermedades animales, vigilando la presencia de residuos nocivos en los alimentos e inspeccionando a los animales para comprobar su aptitud para el consumo. Su experiencia en sanidad animal, combinada con su conocimiento de los patógenos transmitidos por los alimentos, los convierte en profesionales cruciales para mantener un suministro de alimentos seguro desde la granja hasta la mesa (López-Salazar, 2021).

Así mismo, las personas profesionales en medicina veterinaria desempeñan funciones tales como garantizar la disponibilidad de alimentos inocuos a través de la vigilancia, implementación y ejecución de sistemas que incluyen BPM y el Sistema de HACCP. Además, deben llevar a cabo la vigilancia y estudio continuo de las enfermedades con potencial zoonótico a través del consumo de alimentos de origen animal (Vásquez, 2021; Cartín-Rojas, 2014).

Dentro de la industria láctea, estos profesionales cumplen funciones como avalar los productos y subproductos de origen lácteo como alimentos inocuos mediante el estudio y análisis de la composición de los productos incluyendo un examen de características organolépticas, físicas y químicas; análisis bacteriológicos, vigilancia de residuos de

medicamentos, y la inspección de las condiciones higiénicas y posibles adulteraciones que puedan ocurrir a los productos y subproductos lácteos (FAO, 2023).

La industria láctea es un sector que se encuentra en constante crecimiento, por lo que existe una creciente necesidad de contar con profesionales preparados que puedan velar y asegurar la seguridad e inocuidad alimentaria de estos productos. De tal forma, que la pasantía en el Departamento de la Higiene de la Leche del Instituto de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria de Hannover ofreció una oportunidad única para la capacitación y entrenamiento teórico-práctico en el sector de la industria láctea dentro del marco de la salud pública veterinaria de la Unión Europea. La finalidad de esta pasantía fue desarrollar habilidades y destrezas en el manejo y control de las condiciones de calidad de la leche en todo su proceso productivo. De igual forma, adquirir competencias claves en el marco de la salud pública, y obtener conocimiento de nuevas tecnologías aplicadas en la industria de lácteos que puedan ponerse en marcha en el país para la mejora de la inocuidad alimentaria, de la producción láctea y de la salud de los consumidores.

1.3. Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Realizar una pasantía en el Departamento de Higiene de la Leche del Instituto de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania para fortalecer destrezas, conocimientos y habilidades en el área de la inspección y microbiología de lácteos para consumo humano.

1.3.2 Objetivos específicos

1.3.2.1 Incrementar el conocimiento de los peligros físicos, químicos y biológicos presentes en la leche y sus derivados y las medidas de buenas prácticas aplicadas para su vigilancia y control en producción primaria.

1.3.2.2 Reforzar el conocimiento sobre el sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control y la aplicación de buenas prácticas de manufactura en la planta de procesamiento de lácteos.

1.3.2.3 Fortalecer habilidades sobre los métodos de recolección y envío de muestras de productos y subproductos lácteos para análisis microbiológico y químico.

1.3.2.4 Mejorar destrezas en la aplicación de métodos de diagnóstico laboratorial para el análisis microbiológico de lácteos con el fin de identificar trazas de medicamentos y patógenos bacterianos.

2. METODOLOGÍA

2.1 Lugar de realización de la pasantía

La pasantía se llevó a cabo en el Departamento de Higiene de la Leche del Instituto de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania, con el aval de Dra. Madeleine Plötz, directora y jefe del mismo. En este departamento se llevan a cabo actividades de docencia e investigación con un enfoque en la calidad, seguridad e higiene de los alimentos de origen animal. En el componente de docencia, este departamento es responsable de la capacitación de estudiantes en los cursos de higiene de la carne, ciencia láctea y ciencia de los alimentos.

2.2 Período de ejecución

El periodo de pasantía abarcó cuatro meses, del 1° de febrero al 31 de mayo de 2024, en un horario de 8:00 am a 4:00 pm. Durante ese periodo se cumplió con 598 horas contacto en el Departamento de Higiene de la Leche del Instituto de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania. En este lapso, se alcanzó la capacitación en pruebas laboratoriales de calidad e inocuidad de lácteos, y en visitas a campo coordinadas para la evaluación de buenas prácticas aplicadas a instalaciones pecuarias y plantas de proceso, y para la toma de muestras para su posterior análisis en el laboratorio.

2.3 Protocolos abordados

A continuación (Cuadro 1), se presentan los principales protocolos de análisis de calidad de leche, yogur y quesos, aplicados en muestras recibidas durante el proceso de pasantía.

Cuadro 1. Protocolos de análisis laboratoriales en lácteos, y normas base aplicadas durante la pasantía en el Departamento de Higiene de la Leche del Instituto de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania de febrero a junio 2024.

Objetivo	Protocolo aplicado	Norma Base
Determinar el recuento bacteriano en queso y yogur veganos	Método horizontal para el recuento de microorganismos, método de recuento de colonias a 30 °C (L 00.00-88).	EN ISO 6887-1:2017 (Anexo 1)
Detectar y enumerar <i>Enterobacteriaceae</i> en lácteos.	Método horizontal para la detección y enumeración de <i>Enterobacteriaceae</i> en lácteos (L 00.00-133/2)	EN ISO 6887-1:2017 (Anexo 2)
Aplicar procedimientos para detectar <i>Escherichia coli</i> β -glucuronidasa positiva en lácteos.	Método de recuento de colonias a 44 °C con 5-bromo-4-cloro-3-Indol-beta-D-glucurónido	EN ISO 6887-1:2017 (Anexo 3)
Detección, enumeración y serotipificación de <i>Salmonella</i> .	Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de <i>Salmonella</i> (L 00.00-20)	EN ISO 6579:2007-10 (Anexo 4)
Detección y enumeración de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria spp</i>	Método horizontal para la detección y enumeración de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Listeria spp</i> (L 00.00-32/1)	Adopción de DIN EN ISO 11290-2, septiembre de 2017 (Anexo 5)
Detección de patógenos en yogurt.	Test Yogurt	Desafío ensayo yogurt (Anexo 6)
Detección de patógenos en queso.	Test Queso	Desafío ensayo con queso (Anexo 7)

Fuente: elaboración propia.

A continuación, se presenta una explicación resumida de cada uno de los protocolos aplicados.

2.3.1 Método oficial L 00.00-88. Método horizontal para el recuento de microorganismos, método de recuento de colonias a 30°C.

El Método Oficial L 00.00-88 se utiliza para verificar la calidad microbiológica de los productos lácteos mediante el recuento de microorganismos viables. La muestra fue homogeneizada y se realizaron diluciones seriadas en solución salina estéril. Posteriormente, se realizaron siembras de alícuotas de diluciones en Agar de Recuento en Placa (PCA) utilizando la técnica de siembra en superficie. Las placas se incubaron durante 72 horas a

30°C en posición invertida. Después del período de incubación, se contaron las colonias que se desarrollaron entre 30 y 300 en cada placa y se calcularon las concentraciones de microorganismos en unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o UFC/ml). Esto ayudó a medir la carga microbiana de la muestra, así como a asegurar su calidad microbiológica.

2.3.2 L 00.00-133/2: Método horizontal para la detección y enumeración de *Enterobacteriaceae* en lácteos

El método L 00.00-133/2 se aplicó para detectar y enumerar *Enterobacteriaceae* en productos lácteos. Primero, se homogenizó la muestra y se realizaron diluciones seriadas en solución salina estéril. Luego, se sembraron alícuotas de las diluciones en placas con agar Violeta Rojo Bilis Glucosa (VRBG), extendiéndolas de manera homogénea. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Después de la incubación, se contaron las colonias típicas de *Enterobacteriaceae*, identificadas por su color rojo o púrpura con halo opaco, y se calculó su concentración en unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o UFC/ml). En caso de duda, se realizaron pruebas bioquímicas adicionales para confirmar la identificación. Este proceso permitió evaluar la presencia y cantidad de *Enterobacteriaceae* en la muestra, asegurando su calidad microbiológica.

2.3.3 Método de recuento de colonias a 44 °C con 5-bromo-4-cloro-3-Indol-beta-D-glucurónido

El protocolo consistió en homogeneizar la muestra (de agua o alimentos) y realizar diluciones seriadas en solución salina estéril o buffer peptonado, para luego sembrar alícuotas en placas de Petri con un medio de cultivo que contiene el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido (X-Gluc), el cual es hidrolizado por la enzima β-glucuronidasa producida por *E. coli*, generando colonias azules o azul-verdosas; las placas se incuban a 44 °C durante 18-24 horas para seleccionar específicamente *E. coli*, tras lo cual se cuentan las colonias coloreadas para estimar la concentración en UFC/g o UFC/ml, y en caso de dudas, se realizan pruebas bioquímicas o moleculares adicionales para confirmar la identificación.

2.3.4 L 00.00-20: Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella*

Se aplicó el método horizontal para la detección, enumeración y serotipificación de *Salmonella*. Primero, se prepararon las muestras homogenizadas y se realizaron diluciones seriadas. Luego, se utilizaron medios selectivos como Rappaport, XLD o Hektoen para la inoculación preliminar e incubación a 42 o 37 °C durante 24 horas. Después, se seleccionaron colonias sospechosas en función de su morfología y se confirmaron con pruebas bioquímicas, por ejemplo, pruebas de TSI y de descarboxilasa de lisina. Finalmente, se realizó la serotipificación mediante aglutinación con antisueros de serogrupos conocidos para la identificación. Este procedimiento fue exitoso para la detección, enumeración y clasificación de cepas de *Salmonella* en las muestras examinadas.

2.3.5 L 00.00-32/1: Método horizontal para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp*

Se utilizó el método horizontal para la búsqueda y conteo de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp*. En primer lugar, se llevó a cabo la homogenización de las muestras y diluciones seriadas en un medio selectivo apropiado. Posteriormente, la siembra en medios como PALCAM o Oxford fue realizada para la recuperación y aislamiento primario de *Listeria*, cuya incubación fue a 37 °C por 24 horas a 48 horas. Después se realizaron pruebas de confirmación bioquímicas tales como la prueba de catalasa y movilidad y fermentación de carbohidratos que mostraban *Listeria monocytogenes* y otras especies morfológicas sospechosas. Finalmente, por medio de hemólisis en agar sangre, se diferenciaron *Listeria monocytogenes* de otras especies. Con esto se logró la detección y conteo de *Listeria monocytogenes* y otras especies del género en las muestras analizadas.

2.3.6 Prueba de Yogurt

Se realizó la prueba de Yogurt para evaluar las características microbiológicas y organolépticas del yogur. Inicialmente, se tomaron muestras del producto y se prepararon diluciones seriadas en solución estéril para su análisis microbiológico. Se sembraron alícuotas en medios selectivos como agar Manitol Sal para la detección de *Staphylococcus aureus* y agar VRBL (violeta rojo bilis glucosa), para coliformes, incubándose a las temperaturas y tiempos adecuados según cada microorganismo. Paralelamente, se evaluaron los atributos organolépticos del yogur, como sabor, aroma, textura y apariencia, mediante una prueba

sensorial con un panel de jueces capacitados. Finalmente, se analizaron los resultados microbiológicos y sensoriales para determinar la calidad y seguridad del producto, asegurando su cumplimiento con los estándares establecidos.

2.3.7 Prueba de queso

La prueba con el queso se realizó para analizar los aspectos microbiológicos, fisicoquímicos y organolépticos del queso. Primero, se tomó una muestra del producto y se realizó un análisis microbiológico haciendo diluciones en serie en una solución estéril. Las muestras del producto se inocularon en medios selectivos como el agar Baird-Parker para *Staphylococcus aureus*, el agar VRBL para coliformes y el medio DRBC para mohos y levaduras, que fueron incubados a la temperatura y tiempo previamente establecidos. Además, algunos parámetros fisicoquímicos como pH, humedad y contenido de grasa fueron determinados aplicando los respectivos métodos estándar. Al mismo tiempo, se realizó una evaluación organoléptica por un panel capacitado que valoró el queso en relación con su sabor, aroma, textura y apariencia. Los resultados obtenidos hicieron posible evaluar la calidad y seguridad del queso de acuerdo con los requisitos establecidos para el mismo.

2.4 Pruebas ejecutadas

2.4.1 Prueba de detección de catalasa

La prueba de catalasa busca determinar si alguna bacteria presenta la catalasa como parte de su metabolismo. Esta prueba es parte de las Tasas de Actividad Microbiana y se hace mediante el uso de peróxido de hidrógeno, que se utiliza para diferenciar entre microorganismos catalasa positiva (*Staphylococcus*) y los microorganismos negativos a catalasa (*Streptococcus*). Es un procedimiento rápido y muy sencillo de realizar, por ello se utiliza como una forma de rutina para el diagnóstico inicial de las bacterias (Santolaya Hernández, 2024). Para esto, se tomó una placa de Petri de la colonia y con una espátula de metal se fileteó e inyectaron unas gotas de peróxido de hidrógeno al tres por ciento al preparado. Si la muestra contenía una colonia capaz de sintetizar la catalasa, en la misma se distinguían burbujas de gas oxígeno que aparecían casi instantáneamente. En caso negativo para la hipótesis probada, no aparecerán burbujas. La prueba se realizó bajo condiciones controladas para evitar puntos sucios o falsos positivos por contaminación, viento o la misma exposición al aire.

2.4.2 Prueba de detección de oxidasa

Otra de las pruebas que se hizo es la de oxidasa, la cual es un procedimiento microbiológico que busca la calidad en productos lácteos y la contaminación por la presencia de bacterias oxidasa positivas. La prueba consistió en colocar poco de la muestra de leche sobre un papel de filtro o tubo de ensayo. Se añadieron gotas oxidasa y se esperó a que en la presencia de las bacterias se produjera un cambio de color debido a la acción de la enzima citocromo C oxidasa. Este cambio se dio en unos minutos y el color se tornó violeta.

2.4.3 Prueba de detección de *Escherichia coli*

La prueba que se ejecutó para la detección de *Escherichia coli* incluyó un medio cromogénico selectivo utilizado durante la práctica, el cual estuvo diseñado para aislar y enumerar *Escherichia coli*. Este medio contenía sales biliares para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y un sustrato cromogénico, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronido, que es escindido específicamente por la enzima β -glucuronidasa producida por *E. coli*. Cuando *E. coli* estaba presente, se observaron colonias de color azul o azul verdoso, lo que facilitó su identificación de manera rápida y eficiente.

2.4.4 Prueba cuantitativas de *Listeria*

La prueba de *Listeria* es una técnica microbiológica que permite la detección y posible conteo de las bacterias del género *Listeria*, en especial *Listeria monocytogenes*, en diferentes tipos de alimentos o en las superficies de trabajo o en el entorno. A continuación, se describe el procedimiento aplicado durante la pasantía.

Aproximadamente un gramo de la muestra se diluyó en solución salina y se homogeneizó para su preparación. Posteriormente, la muestra se sometió a una fase de enriquecimiento en un caldo selectivo para favorecer el crecimiento de *Listeria*. Luego, se realizó un cultivo en placas con medios selectivos, como PALCAM o agar cromogénico, donde las colonias se incubaron y cuantificaron. En caso de observación de colonias sospechosas, se llevaron a cabo pruebas de confirmación, que incluyeron ensayos bioquímicos y métodos moleculares como PCR, para garantizar una identificación precisa de las especies de *Listeria*. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de muestra.

2.4.5 Cultivo en agar VRGB

El agar VRGB (violeta rojo bilis glucosa) es un medio de cultivo selectivo y diferencial que se utiliza para la enumeración de enterobacterias en alimentos, agua y otras muestras. Contiene sales biliares y violeta cristal para inhibir las bacterias Gram positivas. También contiene glucosa como carbohidrato fermentable, rojo neutro como indicador de pH y agar como agente solidificante. Cuando las enterobacterias fermentan la glucosa, producen ácido, lo que hace que el medio se vuelva rojo alrededor de las colonias debido al indicador rojo neutro (Santolaya Hernández, 2024).

El procedimiento para la prueba de detección de bacterias coliformes utilizando agar VRGB incluyó: preparación del medio disolviendo el agar en agua destilada, esterilizándolo y vertiéndolo en placas de Petri. Se obtuvo la muestra, diluyéndola o filtrándola según sea necesario. Luego se inoculó la muestra en el agar, distribuyéndola homogéneamente o mezclándola con el agar fundido. Se hizo el proceso de incubación de las placas a 35-37 °C durante 18-24 horas en posición invertida. Se realizó la observación y conteo de las colonias de color rojo a púrpura, indicativas de bacterias coliformes. Por último, se procedió a interpretar los resultados basándose en la fermentación de glucosa y la inhibición de microorganismos no coliformes por la bilis en el medio.

2.4.6 Prueba Staphylasa

La prueba de Staphylasa se utiliza en la industria láctea para detectar *Staphylococcus aureus* en la leche cruda y los productos lácteos, en particular porque este patógeno está asociado con enfermedades transmitidas por los alimentos y puede contaminar la leche a través de vacas infectadas o una manipulación inadecuada. Este ensayo rápido identifica *S. aureus* detectando factores de aglutinación y proteína A, que son indicativos de la presencia de la bacteria (Fagundes et al., 2010). La prueba Staphylasa, también conocida como prueba de coagulasa, se utiliza para detectar la presencia de *Staphylococcus aureus*. Esta bacteria es la única que produce la enzima coagulasa, que puede convertir el fibrinógeno en fibrina, causando la coagulación del plasma.

En la prueba, se mezcla un cultivo sospechoso con plasma de conejo o humano. Si hay coagulación, se considera un resultado positivo, indicando la presencia de *S. aureus*. Si no hay coagulación, el resultado es negativo, lo que sugiere que no hay *S. aureus* o que se trata de otra especie de estafilococo.

2.4.7 Prueba de coagulasa en tubo

Se preparó una suspensión de la bacteria en solución salina estéril. Posteriormente, se añadió una cantidad específica de plasma de conejo a un tubo de ensayo y se inoculó con la bacteria, mezclando suavemente. El tubo se incubó a 37 °C durante cuatro horas; en caso de no observarse coagulación, se continuó la incubación hasta 24 horas. Finalmente, se evaluó la formación de un coágulo (gel) en el plasma. Un resultado positivo se interpretó como la presencia de coagulasa, evidenciado por la formación de un coágulo, mientras que un resultado negativo se determinó cuando el plasma permaneció líquido.

2.4.8 Prueba de coagulasa en portaobjetos

En un portaobjetos limpio y seco, se colocó una gota de plasma de conejo. Con un asa bacteriológica, se tomó una pequeña cantidad de la colonia de *Staphylococcus* y se mezcló con la gota de plasma. Se observó la mezcla durante los primeros diez segundos para detectar la formación de grumos. Un resultado positivo se registró cuando se observó aglutinación rápida, mientras que la ausencia de grumos indicó un resultado negativo.

La prueba de coagulasa es un indicador clave para diferenciar especies de *Staphylococcus*. Un resultado positivo generalmente indica la presencia de *Staphylococcus aureus*, una especie reconocida por su patogenicidad y asociada con diversas infecciones en humanos. Por otro lado, un resultado negativo sugiere la presencia de especies menos patógenas, como *Staphylococcus epidermidis*, que comúnmente forma parte del microbiota normal de la piel, pero puede actuar como un patógeno oportunista en ciertas condiciones.

2.4.9 Prueba de coagulasa de cultivo en Chromoagar

La prueba de coagulasa en Agar Cromogénico es una técnica microbiológica que detecta *Staphylococcus aureus* en base a su capacidad para producir la enzima coagulasa. Este medio cromogénico contiene sustratos específicos para *Staphylococcus aureus* que se hidrolizan para dar lugar a una morfología colonial distintiva (generalmente un color rosa o rojo) que lo diferencia de otras especies de *Staphylococcus* no coagulasa negativa (D'Amico y Donnelly, 2010).

Para realizar la prueba, se tomó una muestra del microbio y se inoculó en la superficie del agar cromogénico al esparcirla uniformemente sobre la superficie con un asa estéril. Las placas se incubaron a 35-37 °C durante 24-48 horas. Posteriormente, se registró el crecimiento

de colonias y aquellas que presentaban el color específico que indica *S. aureus* fueron seleccionadas. Si había dudas, se realizaron pruebas adicionales como la prueba de coagulasa en tubo para confirmar la presencia de la enzima.

2.5 Detección de trazas de antibióticos en las muestras

En el Departamento donde se llevó a cabo la presente pasantía, se emplean diversos métodos avanzados para la detección de residuos de antibióticos y trazas en muestras de leche, en donde pude observar y adquirir conocimientos sobre la aplicación de estas técnicas.

Una de las metodologías destacadas fue el uso de Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS) ya que esta metodología permitió identificar y cuantificar los niveles de contaminantes en la muestra con gran precisión. Además, se realizaron ensayos inmunológicos como ELISA que sirvieron para hacer pruebas de cribado rápido y en el caso de resultados positivos, estos fueron seguidos por pruebas más detalladas por HPLC-MS. Las técnicas utilizadas hicieron posible cumplir con los requisitos de calidad y seguridad alimentaria establecidos por la legislación vigente.

2.6 Coordinación de las visitas de campo

Se organizaron visitas de campo con clientes externos, tanto de granjas lecheras como de plantas de procesamiento de lácteos. Durante estas visitas, se recopilaron muestras del equipo y se tomaron hisopos de superficie relevantes de las áreas de recolección, transporte, almacenamiento y enfriamiento para verificar la presencia de cualquier bacteria patógena que pudiera comprometer la seguridad alimentaria.

El proceso fue guiado por un tutor práctico el cual fijaba la fecha de ejecución de la visita. Los pasantes, como mi persona, cumplían la función de observadores y realizaban anotaciones sobre todos los procesos que se cumplían durante la visita. Se tomaron rasgos de la comunicación del tutor guía con las personas encargadas en las empresas, y se observó el proceso de toma de muestras detallando cada técnica aplicada por el tutor guía. Se monitoreó el uso de los elementos de bioseguridad, así como la toma, resguardo y traslado de las muestras hacia el laboratorio.

Durante el proceso de observación el tutor práctico iba consultando a los pasantes sobre conocimientos en el manejo de técnicas, instrumentos y conceptos importantes relacionados con la calidad microbiológica de la leche. Al final de cada visita guiada se ofrecía un balance de lo aprendido al tutor práctico y se exponían las dudas que pudieran surgir durante el proceso.

Durante el desarrollo de la pasantía como analista de calidad de leche y sus derivados, se implementaron rigurosamente las buenas prácticas en producción primaria para asegurar la calidad y seguridad del producto desde su origen. En esta fase inicial, se supervisó el manejo y alimentación de los animales productores de leche, controlando parámetros de higiene y sanidad en las instalaciones. Se llevaron a cabo evaluaciones constantes para verificar que las condiciones de salud de los animales y las prácticas de ordeño cumplieran con los estándares establecidos, minimizando así el riesgo de contaminación microbiológica y manteniendo la calidad del producto desde la fuente.

En la fase de proceso, se aplicaron estrictas BPM para asegurar la integridad de la leche y sus derivados durante el procesamiento y envasado. Estas incluyeron controles exhaustivos de temperatura, monitoreo de equipos, y procedimientos de limpieza y desinfección para evitar cualquier contaminación cruzada en la planta de procesamiento. Además, se verificó el cumplimiento de los estándares de calidad en cada etapa de transformación, garantizando que los productos finales cumplieran con los requisitos de inocuidad alimentaria y las normativas internacionales. Este enfoque riguroso en ambas fases permitió mantener la calidad y seguridad de los productos lácteos, asegurando una alta confianza en su consumo y distribución.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Distribución horaria de pasantías

Durante el proceso de la pasantía se ejecutaron un total de 598 horas, que corresponden a 520 horas en el laboratorio y 78 horas de trabajo de campo.

En el laboratorio se participó en una variedad de actividades esenciales destinadas a garantizar la seguridad y calidad del producto, que incluyeron toma y procesamiento de muestras de leche cruda y productos derivados como queso y yogurt. De igual forma, se desarrollaron análisis microbiológicos, químicos y sensoriales para evaluar la calidad de las muestras en diferentes etapas de procesamiento. Esto incluyó preparación de series de pruebas, uso de instrumentos analíticos y documentación meticulosa de los resultados obtenidos. Se aprendió sobre el manejo de normas de seguridad alimentaria y los protocolos de garantía de calidad, colaborando estrechamente con los supervisores de laboratorio y otros miembros del equipo para respaldar los procesos generales de control de calidad dentro del entorno de producción láctea.

Las actividades de campo incluyeron visitas para valoración de las rutinas diarias de fincas dedicadas a la producción láctea, así como, plantas de procesamiento de lácteos. Incluyó la toma de muestras de leche cruda y productos terminados, toma de muestras de los instrumentos utilizados durante la recolección de la leche, así como de los refrigeradores donde se almacenaba la leche, supervisión de procesos, evaluaciones de calidad y valoración de la eficiencia de la limpieza para garantizar el cumplimiento de los estándares de higiene.

También se participó en el seguimiento de los procesos de producción, ayudando a implementar medidas de control de calidad y participando en acciones de resolución de problemas. Esta experiencia práctica permitió obtener información sobre todo el ciclo de producción láctea, desde el manejo de la materia prima hasta el empaque del producto final, contando con la colaboración de los tutores guía y el personal que tiene experiencia en estas labores en los sitios visitados.

3.2 Distribución de muestras analizadas y principales pruebas realizadas

Se participó de forma directa en el procesamiento de 113 muestras de productos lácteos para el análisis de calidad, incluyendo el procesamiento y evaluación de los principales tipos de derivados lácteos que se consumen en el mercado. La distribución de muestras analizadas durante el período de la pasantía se muestra en el Cuadro 2:

Cuadro 2. Distribución total de muestras analizadas durante proceso de pasantías en el Departamento de Higiene de la Leche del Instituto de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania

Tipo de muestras	Tinción Gram y pruebas catalasa, oxidasa y morfología	Pruebas cualitativas de <i>Listeria</i>	Cultivo en agar VRBG (Enterobacterias)	Pruebas de <i>Salmonella</i>	Pruebas cuantitativas de <i>Listeria</i>	Total	Porcentaje
Leche	51	0	0	0	0	51	45,1%
Yogur	17	37	37	37	20	37	32,7%
Queso	15	25	25	25	10	25	22,1%
Total	84	62	62	62	30	113	100%

Fuente: elaboración propia

El trabajo se centró en las muestras de leche, fundamentalmente de leche cruda o base, utilizada como en materia prima para las empresas de derivados, sin embargo, también se realizaron análisis de muestras de leche lista para consumo, luego de pasteurización y otros procesos de esterilización de cara a la venta al público.

Con respecto al yogur se estudiaron muestras que permitieron evaluar la calidad de este producto. Se trabajó principalmente en la evaluación de los niveles de acidez y de azúcares libres en el yogur. Además, se valoraron las características microbiológicas y nutricionales, estableciendo una relación con la salud de los animales productores de los tipos particulares de leche que sirvió de base para el producto derivado de yogurt.

En el caso de los quesos, también se abordaron diversos conocimientos sobre evaluación de la calidad de estos derivados. Por ser Alemania un país de importante tradición quesera se recibieron muestras de varios tipos de quesos tales como el Allgäuer Emmentaler, Bergkäse, Gouda, Tilsiter, Quark, Käsewürmer, Limburger, entre otros. Muchas de estas muestras analizadas fueron de origen industrial, pero también, hubo una importante presencia

de quesos artesanales, en los cuales su calidad era biológicamente más cercana a la materia cruda de leche.

Las principales pruebas realizadas en las actividades de laboratorio fueron las más comunes para la calidad biológica de los productos de leche y derivados lácteos. El detalle de estas se muestra a continuación:

Las principales pruebas ejecutadas fueron la tinción Gram, prueba de catalasa, prueba de oxidasa, y la determinación de morfología mediante observación en el microscopio en solución salina. Las pruebas realizadas se derivan del marco regulatorio de la Unión Europea (Reglamento -CE- No 853/2004 UE, 2004) que es el ente general que impone condiciones de calidad en lácteos en el país donde se ubica el instituto donde se realizaron las pasantías.

La aplicación de estas pruebas permitió afianzar conocimientos en el análisis de la calidad de la leche y productos lácteos derivados. Por ejemplo, la prueba de tinción Gram es esencial para evaluar la contaminación microbiana, particularmente para identificar patógenos asociados con la mastitis y otros problemas de calidad en la leche, ayudando así a garantizar la seguridad y calidad de los productos lácteos (Vázquez-Ojeda et al., 2014).

La prueba de catalasa ayuda a identificar contaminantes microbianos potencialmente dañinos en la leche, lo que permite a los productores de lácteos tomar acciones correctivas para garantizar la inocuidad y calidad del producto, lo que en última instancia contribuye a una mejor higiene y vida útil de los productos lácteos (Santolaya Hernández, 2024).

La prueba de detección de oxidasa ayuda a diferenciar ciertas especies bacterianas, particularmente aquellas que son organismos patógenos o de deterioro, ayudando así en la evaluación de la calidad e inocuidad de la leche durante la producción y el procesamiento (Vázquez-Ojeda et al., 2014).

3.3 Muestras de leches recibidas para determinación de presencia de mastitis

En total se recibieron 32 muestras de leche para determinar presencia de mastitis. Para ello se realizaron pruebas secundarias para determinación de las bacterias presentes (prueba KOH, prueba de Catalasa, prueba de oxidasa, prueba *Staphylasa*, prueba de coagulasa cultivo en Chromoagar, cultivos en agar de esculina ultravioleta) y se realizó la posterior confirmación de las bacterias en Maldi-TOF.

3.4 Muestras de lácteos para determinación cualitativa de *Listeria*

En total se aplicaron 62 pruebas cualitativas de *Listeria* mediante cultivos en caldos específicos para *Listeria* caldo *Frasser* y *half frasser* y posterior cultivo en placas de agar de *Listeria brilliance* y placas de Palcam). El detalle de las muestras analizadas para determinación de *Listeria* se detalla en el Cuadro 3:

Cuadro 3. Pruebas cualitativas mediante cultivos en caldos específicos para *Listeria* caldo Frasser y Half Frasser y posterior cultivo en placas de agar de *Listeria* brilliance y placas de Palcam (N=62)

Tipo de muestra	Cantidad	Porcentaje
Yogur	37	59,7 %
Queso	25	40,3%
TOTAL	62	100%

Fuente: elaboración propia.

La *Listeria*, particularmente *Listeria monocytogenes*, es una preocupación importante en la industria láctea debido a su potencial para contaminar los productos lácteos y causar graves riesgos para la salud. Esta bacteria se encuentra comúnmente en ambientes húmedos, incluidas granjas lecheras y plantas de procesamiento, donde puede prosperar en condiciones como agua estancada y en superficies difíciles de limpiar. La *Listeria monocytogenes* puede sobrevivir a la refrigeración y a menudo se asocia con leche no pasteurizada y quesos blandos elaborados con leche cruda, lo que representa un riesgo de listeriosis, una infección grave puede provocar complicaciones como meningitis, septicemia y consecuencias graves para las mujeres embarazadas y sus bebés (Barancelli et al., 2011).

3.5 Pruebas en agar VRGB para determinación de enterobacterias

Para la detección de enterobacterias se aplicó el cultivo en agar VRGB (Violeta Roja Bilis Glucosa) el cual está diseñado específicamente para el aislamiento selectivo y la

enumeración de *Enterobacteriaceae*, una familia de bacterias que incluye patógenos importantes como *E. coli* y *Salmonella*. En total se aplicaron 62 de estas pruebas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Determinación total de presencia de enterobacterias mediante cultivo en agar VRGB (N=62)

Tipo de muestra	Cantidad	Porcentaje
Yogurt	37	59,7 %
Queso	25	40,3%
TOTAL	62	100%

Fuente: elaboración propia.

La detección de *Enterobacteriaceae* en leche y productos lácteos es fundamental para evaluar la calidad microbiológica y la seguridad de estos alimentos. Las enterobacterias sirven como organismos indicadores que reflejan el estado de higiene del proceso de producción y la posible presencia de patógenos. Su presencia en productos lácteos, como leche, queso y yogurt, puede indicar contaminación por materia fecal o fuentes ambientales, lo que supone un riesgo para la salud del consumidor. El monitoreo de los niveles de *Enterobacteriaceae* ayuda a garantizar el cumplimiento de las normas y regulaciones de seguridad alimentaria, lo que permite a los productores implementar las acciones correctivas necesarias para mantener productos de alta calidad. Además, las pruebas periódicas para detectar estas bacterias ayudan a identificar fallas en las prácticas sanitarias, mejorando así la seguridad alimentaria general y protegiendo la salud pública de enfermedades transmitidas por alimentos asociadas con productos lácteos contaminados (Cuesta de Santos, 2018).

Es importante recalcar que la prueba de detección de *E. coli* que utiliza agar TBX cumple con los estándares ISO 16649, lo que garantiza confiabilidad y precisión en la detección de cepas de *E. coli* potencialmente dañinas en productos lácteos, lo cual es crucial para prevenir enfermedades transmitidas por alimentos y mantener la seguridad de la salud pública (Vázquez-Ojeda et al., 2014). Por su parte, el agar VRBG es una prueba que permite la detección de enterobacterias en función de su capacidad para crecer en el medio selectivo y producir ácido a partir de la glucosa (Santolaya Hernández, 2024).

3.6 Pruebas en agar TBX para determinación de presencia de *E. coli*

Durante el desarrollo de la pasantía se ejecutaron 62 pruebas para la determinación de enterobacterias. El detalle de las muestras analizadas se especifica en el Cuadro 5:

Cuadro 5. Cultivo de muestras en agar TBX para determinación de presencia de *E. coli*
(N=62)

Tipo de muestra	Cantidad	Porcentaje
Yogurt	37	59,7 %
Queso	25	40,3%
TOTAL	62	100%

Fuente: elaboración propia.

La prueba de detección de *E. coli* que utiliza agar TBX es un método vital para evaluar la seguridad y calidad microbiana de los productos lácteos. Además, dado que funciona mediante un cambio de coloración cuando hay presencia de *E. coli*, es una prueba sencilla y eficiente (Vázquez-Ojeda et al., 2014).

3.7 Pruebas para determinación de Salmonella

Durante el desarrollo de la pasantía se realizaron 62 pruebas para la detección de salmonella, distribuidas según se detalla en el cuadro 6:

Cuadro 6. Pruebas para determinación de presencia de *Salmonella* mediante cultivos de RVS caldo y MKTT caldo y cultivos en *Salmonella* brilliance agar y XLD agar (N=62)

Tipo de muestra	Cantidad	Porcentaje
Queso	25	40,3%
Yogurt	37	59,7 %
TOTAL	62	100%

Fuente: elaboración propia.

La detección de *Salmonella* en productos lácteos es crucial para garantizar la seguridad alimentaria y la salud pública. La salmonella es un peligroso patógeno transmitido por los alimentos que puede contaminar la leche cruda y los productos lácteos, lo que podría provocar enfermedades graves como la salmonelosis. Los productos lácteos, especialmente los quesos blandos, la leche cruda y los helados, se han identificado como fuentes comunes de brotes de salmonelosis. Las pruebas periódicas de *Salmonella* utilizando métodos como PCR y medios cromogénicos son esenciales para prevenir la contaminación, ya que las bacterias pueden sobrevivir a la pasteurización y prosperar en el entorno de procesamiento de lácteos. Implementar medidas de control efectivas, como controles de proveedores, pasteurización adecuada, buenas prácticas de fabricación y monitoreo ambiental, es clave para minimizar el riesgo de *Salmonella* en la cadena de suministro de productos lácteos y proteger a los consumidores de las graves consecuencias de la salmonelosis (Vázquez-Ojeda et al., 2014).

3.8 Pruebas cuantitativas para *Listeria*

Durante el desarrollo de la pasantía se llevaron a cabo 30 pruebas cuantitativas para *Listeria* (Cuadro 7).

Cuadro 7. Pruebas cuantitativas de *Listeria* spp. (N=30)

Tipo de muestra	Frecuencia	Porcentaje
Yogurt	20	66,7 %
Queso	10	33,3%
TOTAL	30	100%

Fuente: elaboración propia.

El expresar los resultados en términos de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo o mililitro, permitió proporcionar datos esenciales para evaluar la seguridad y la calidad de los productos lácteos e informa las estrategias de gestión de riesgos para prevenir brotes de listeriosis (Barancelli et al., 2011).

3.9 Detección de trazas de antibióticos en muestreos lácteos

De un total de 51 muestras de leche procesadas, 24 fueron seleccionadas para evaluar la presencia de trazas de antibióticos que pudieran hacerlas inapropiadas para el consumo humano. Los resultados de estas pruebas fueron todos negativos, lo que indica que las muestras no contenían residuos de medicamentos veterinarios por encima de los límites establecidos. Este hallazgo es de suma importancia, ya que la presencia de residuos de antibióticos en la leche representa un riesgo potencial para la salud pública, además de generar preocupaciones sobre la resistencia antimicrobiana.

En este contexto, el cumplimiento de los períodos de retiro adecuados, que aseguran que no queden trazas de estos compuestos en la leche, es esencial. Alemania, en particular, mantiene una regulación estricta sobre los residuos de antibióticos en los productos lácteos, dado su compromiso con la seguridad alimentaria y la salud de los consumidores. El hecho de que las muestras hayan resultado negativas subraya el cumplimiento de las buenas prácticas de manejo y el respeto a las normativas vigentes, lo cual es un indicio claro de que los productores están garantizando la inocuidad del producto para el consumo humano.

3.10 Actividades de campo

En el Cuadro 8, se muestra la distribución de horas en actividades de campo.

Cuadro 8. Distribución de horas específicas en lechería realizadas en el Departamento de Higiene de la Leche del Instituto de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania durante la pasantía realizada en Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania, febrero a junio 2024.

Actividad	Horas
Hisopados y muestreos en campo tanto a nivel de ganaderías y muestreo locales de la planta de procesamientos de lácteos de las cocinas del departamento de microbiología y calidad de los alimentos	32
Elaboración de quesos a partir de leche en la cocina procesadora de lácteos del departamento de microbiología de alimentos, bajo estrictos estándares de buenas prácticas de fabricación y especiales cuidado con HACCP para no afectar la calidad y seguridad del producto	46
TOTAL	78

Fuente: elaboración propia.

Se dedicaron 32 horas para la ejecución de hisopados en ganaderías locales, así como muestreos en plantas de procesamiento de lácteos, cocinas de microbiología y la calidad de los alimentos.

Adicionalmente se dedicaron 46 horas en elaboración de quesos a partir de leche en la cocina procesadora de lácteos del departamento de microbiología de alimentos, bajo estrictos estándares de buenas prácticas de fabricación y especiales cuidado con HACCP para no afectar la calidad y seguridad del producto.

En conjunto, las 32 horas dedicadas a los hisopados y muestreos, así como las 46 horas de trabajo en la elaboración de quesos bajo estrictos estándares de buenas prácticas de fabricación y HACCP, permitieron que se cumplieran los objetivos propuestos en esta pasantía y se fortalecieron mis conocimientos sobre la importancia, estándares y

procedimientos que aseguran la vigilancia continua de la calidad e inocuidad de los productos lácteos. Estos esfuerzos son fundamentales para garantizar la seguridad e inocuidad alimentaria y la confianza del consumidor en los productos elaborados.

4. CONCLUSIONES

- 4.1 La pasantía en el instituto de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania, permitió fortalecer competencias profesionales en evaluación de la calidad de la leche y productos derivados como el queso y el yogur. Se adquirieron conocimientos de vanguardia en este campo, con una perspectiva técnica microbiológica pero también con el enfoque propio de la medicina veterinaria aplicada a la producción alimentaria, especialmente en el campo de los lácteos.
- 4.2 Se elevó el conocimiento de los peligros físicos, químicos y biológicos presentes en la leche y sus derivados y las medidas de buenas prácticas aplicadas para su vigilancia y control en producción primaria. Esto se logró mediante el ensayo de tomas de muestras y posterior análisis de laboratorio, de productos lácteos crudo y derivados.
- 4.3 Las actividades de campo, especialmente las llevadas a cabo en plantas procesadoras permitieron reforzar el conocimiento sobre el sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control y la aplicación de buenas prácticas de manufactura en la planta de procesamiento de lácteos. Cabe destacar que en Alemania las plantas suelen presentar altos estándares de seguridad biológicas en el procesamiento de lácteos. Los puntos críticos aplicados funcionan bien en forma general, aunque de igual forma ameritan vigilancia constante.
- 4.4 La recolección de muestras en fincas y en plantas de procesamiento, permitió fortalecer habilidades sobre los métodos de recolección y envío de muestras de productos y subproductos lácteos para análisis microbiológico y químico. Los protocolos seguidos por el Instituto de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania, cumplen de forma completa los estándares de seguridad, lo que permite mayor seguridad en los resultados. Este proceso permitió desarrollar competencias en el manejo de muestras lo que permite mayor confianza en los procesos de seguridad microbiológica de las pruebas a realizar.
- 4.5 El proceso de pasantía a nivel de laboratorio permitió mejorar destrezas en la aplicación de métodos de diagnóstico laboratorial para el análisis microbiológico de lácteos con el fin de identificar trazas de medicamentos y patógenos bacterianos. Esto implicó llevar a la práctica diversos tipos de pruebas estándar y también especializadas que superan las expectativas profesionales en la formación recibida como base.

5. RECOMENDACIONES

- 5.1 Al sector lácteo costarricense industrializado, establecer cooperación con instituciones europeas para la capacitación e implementación de controles más rigurosos, adaptados a las variedades nacionales, con el fin de optimizar la inocuidad y calidad de los productos.. Estos mecanismos podrían incluir controles microbiológicos (como la detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*), análisis de residuos de antibióticos y contaminantes químicos, así como verificaciones de parámetros fisicoquímicos (pH, contenido graso, densidad). La adaptación de estos controles a las variedades lácteas nacionales permitiría fortalecer la inocuidad y la calidad del producto.
- 5.2 A los productores de lácteos, es necesario realizar un constante monitoreo de los procesos de calidad de los lácteos para implementar las tecnologías de vanguardia dirigidas a mejorar y optimizar los sistemas de seguridad en la toma de muestra y análisis.
- 5.3 A la población costarricense, para que vele por la compra y el consumo de alimentos certificados en origen, inocuidad y calidad con el fin de prevenir las ETAs derivadas del consumo de leche y derivados.
- 5.4 A la Unidad Académica y encargados del pensum de la Escuela de Medicina Veterinaria, es importante fortalecer la formación en relación con el rol determinante que tiene en el aseguramiento de la inocuidad alimentaria pues esto permite que el desarrollo de profesionales que actúen a favor del cuidado alimentario humano, pero también comprendiendo los beneficios del cuidado y bienestar animal.
- 5.5 Se hace pertinente que las autoridades gubernamentales costarricenses promuevan la inclusión y permanencia de los profesionales de la veterinaria en la industria láctea, esto para aprovechar el perfil productivo con el que cuenta este tipo de personal capacitado en áreas vinculadas con la salud animal y fortalecer el sector para asegurar que la vigilancia sea llevada a cabo por el profesional competente en la materia desde la finca a la mesa.
- 5.6 Es necesario que tanto las universidades como el Colegio de Profesionales en Medicina Veterinaria promuevan la realización periódica de capacitaciones a pequeños y medianos productores, ya que muchos incumplen con medidas básicas de buenas prácticas, mejorando de esta forma la trazabilidad de los productos lácteos en Costa Rica.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguilera-Becerra, A. M., Urbano-Cáceres, E. X., & Jaimes-Bernal, C. P. (2014). Bacterias patógenas en leche cruda: Problema de salud pública e inocuidad alimentaria. *Ciencia y Agricultura*, 11(2), 83–93. ISSN: 0122-8420
- Álvarez-Hernández, D. E., Díaz Flores, M., & Ortiz Reynoso, M. (2015). Brucelosis, una zoonosis frecuente. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/49566>
- Argudín, M. A., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1751–1773. <https://doi.org/10.3390/toxins2071751>
- Banco Mundial. (2011). Module 4 – Smallholder dairy production. Agriculture Investment Sourcebook. <https://documents.worldbank.org>
- Barancelli, G. V., Silva-Cruz, J. V., Porto, E., & Oliveira, C. A. (2011a). *Listeria monocytogenes*: Ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. *Arquivos do Instituto Biológico*, 78(2), 155–168.
- Barancelli, G. V., Silva-Cruz, J. V., Porto, E., & Oliveira, C. A. F. (2011b). *Listeria Monocytogenes*: Ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. <http://www.repositoriobiologico.com.br/jspui/handle/123456789/1011>
- Barrientos, O., & Villegas, L. (2010). Cadena productiva de leche. Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria & Ministerio de Agricultura y Ganadería. http://sepsa.go.cr/docs/2010_Politica_SectorAgro_Leche.pdf
- Bennett, N. (2008). Manual de procedimientos de las funciones del inspector veterinario de los establecimientos elaboradores de productos lácteos. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de la República Oriental del Uruguay. https://www2.sag.gob.cl/pecuaria/establecimientos_habilitados_exportar/normativa/uruguay/lacteos/MP_inspector_establ_prod_lacteos.pdf
- Briones Dieste, V., Bezos Garrido, J., & Álvarez Sánchez, J. (2018). Concepto y contenidos actuales de salud pública y política sanitaria veterinarias. *Revista Española de Salud Pública*, 92, e201810077. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272018000100310
- Cámara Nacional de Productores de Leche de Costa Rica. (2017). Consumo de productos de leche. <http://proleche.com/consumo-de-productos-lacteos/>

- Cartín-Rojas, A. (2014). Perspectivas sobre salud pública veterinaria, seguridad alimentaria y la iniciativa conjunta 'Una Salud'. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 36, 193–196.
- Cartín-Rojas, A., & Pascual Barrera, A. (2021). Alimentos de origen animal y Enfermedades de Transmisión Alimentaria en Costa Rica: 2015- 2020. *UNED Research Journal*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.22458/urj.v13i2.3587>
- Celis, M., & Juárez, D. (2009). *Microbiología de la leche*. Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional. Argentina.
http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_microb_09/microbiologia_leche.pdf
- Clínica Universidad Navarra [CUN]. (2023). La importancia de consumir leche. Clínica Universidad Navarra. <https://www.cun.es/chequeos-salud/vida-sana/nutricion/importancia-consumir-leche>
- Codex Alimentarius. (2020). Código de prácticas de higiene para la leche y los productos lácteos (CAC/RCP 57-2004). FAO/OMS. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/codes-of-practice/en/>
- Cuesta de Santos, A. (2018). Control de calidad en la industria de productos lácteos (Trabajo Final de Grado, Universidad de Valladolid). Universidad de Valladolid.
<https://uvadoc.uva.es/handle/10324/31477>
- Davys, G., Marshall, J. C., Fayaz, A., Weir, R. P., & Benschop, J. (2020). Campylobacteriosis associated with the consumption of unpasteurised milk: Findings from a sentinel surveillance site. *Epidemiology & Infection*, 148, e16.
<https://doi.org/10.1017/S0950268819002292>
- Delfino, D. (2025). Costa Rica lidera en consumo de leche en Latinoamérica y fortalece su producción local. *Delfino. En tendencia*. <https://delfino.cr/2025/06/costa-rica-lidera-en-consumo-de-leche-en-latinoamerica-y-fortalece-su-produccion-local>
- Fernández Bolaños, O. F., Trujillo Graffe, J. E., Peña Cabrera, J. J., Cerquera Gallego, J., & Granja Salcedo, Y. (2012). Mastitis bovina: Generalidades y métodos de diagnóstico. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 13(11), 1–20.
- Food Safety News (2023). Scientists look into Listeria risk in Costa Rica and Ecuador. *Food Safety News. News Desk*. <https://www.foodsafetynews.com/2023/12/scientists-look-into-listeria-risk-in-costa-rica-and-ecuador/>
- Galeano, C. R., Mojica, C. P., Rojas, O. A., & Romero Zúñiga, J. J. (2020). Aspectos epidemiológicos de la brucelosis en humanos en las Áreas Rectoras Aguas Zarcas y

- Los Chiles, Costa Rica, 2015–2017. *Ciencias Veterinarias*, 38(1), 1–16.
<https://doi.org/10.15359/rev.38-1.1>
- Giralt-Zúñiga, M., Redondo-Solano, M., Moura, A., Tessaud-Rita, N., Bracq-Dieye, H., Vales, G., Thouvenot, P., Leclercq, A., Chaves-Ulate, C., Núñez-Montero, K., Guillén-Watson, R., Rivas-Solano, O., Chanto-Chacón, G., Duarte-Martínez, F., Soto-Blanco, V., Pizarro-Cerdá, J., & Lecuit, M. (2023). Genome-based characterization of *Listeria monocytogenes*, Costa Rica—Volume 29, Number 12—December 2023—Emerging Infectious Diseases journal—CDC. *Emerging Infectious Diseases*, 29(12). <https://doi.org/10.3201/eid2912.230774>
- González, P. (2018). Definiciones de leche y queso. *Codex Alimentarius*. Biblioteca del Congreso Nacional de Chile (Supl. 117.208).
<https://www.camara.cl/verDoc.aspx?prmID=147097&prmTIPO=DOCUMENTOCO>
MISION
- Grace, D., Wu, F., & Havelaar, A. H. (2020). MILK Symposium review: Foodborne diseases from milk and milk products in developing countries—Review of causes and health and economic implications. *Journal of Dairy Science*, 103(11), 9715–9729. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18323>
- Guaraca, E., & Guaraca, L. (2019). [Trabajo de titulación, Universidad de Cuenca]. Universidad de Cuenca.
<https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/33798/1/Trabajo%20de%20Titulaci%C3%B3n.pdf>
- Huertas Sánchez, G. (2020). Análisis descriptivo de la prevalencia y resistencia antimicrobiana de *Salmonella* entérica no tifodea durante el período postparto de vacas lecheras en la Región Central y Norte de Costa Rica.
<https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/19000>
- Intedya. (2020). Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).
<https://www.intedya.com/internacional/103/consultoria-buenas-practicas-de-manufactura-bpm.html>
- Katial, A. (2018). Costa Rica Food Processing Ingredients (p. 20). USDA Foreign Agricultural Service.
https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Food+Processing+Ingredients_San+Jose_Costa+Rica_3-28-2018.pdf

- Kirk, M. D., Pires, S. M., Black, R. E., Caipo, M., Crump, J. A., Devleeschauwer, B., Döpfer, D., Fazil, A., Fischer-Walker, C. L., Hald, T., Hall, A. J., Keddy, K. H., Lake, R. J., Lanata, C. F., Torgerson, P. R., Havelaar, A. H., & Angulo, F. J. (2015). World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS medicine*, *12*(12), e1001921. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001921>
- Lazo-Láscarez, S., Gutiérrez, L. Z., Duarte-Martínez, F., Romero Zúñiga, J. J., Arias Echandi, M. L., & Muñoz-Vargas, L. (2021). Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity of *Campylobacter* spp. Isolated from Broiler Chicken at Three Levels of the Poultry Production Chain in Costa Rica. *Journal of food protection*, *84*(12), 2143–2150. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-111>
- Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and molecular research: GMR, *2*(1), 63–76.
- López-Salazar, C. (2021). Epidemiología veterinaria y salud pública veterinaria. *Revista Agrociencia*, *5*(20), 70–73. <https://doi.org/10.5281/zenodo.10641123>
- Ministerio de Salud de Costa Rica. (2022). Reportes y estimaciones sobre enfermedades de transmisión alimentaria en Costa Rica. Ministerio de Salud. <https://www.ministeriodesalud.go.cr>
- Ministerio de Salud de Costa Rica. (2024). Situación Epidemiológica de Enfermedad Diarreica Aguda (EDA) al 16 de diciembre de 2024. Boletín Epidemiológico N° 49. <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca/material-educativo/material-publicado/boletines/boletines-vigilancia-vs-enfermedades-de-transmision-vectorial/boletines-epidemiologicos-2024/8645-boletin-epidemiologico-n-49-2/file>
- Oliver, S. P., Jayarao, B. M., & Almeida, R. A. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, *2*(2), 115–129. <https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.115>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (1998). Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP) y directrices para su aplicación. <https://www.fao.org/4/y1579s/y1579s03.htm>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2023). Inocuidad y calidad de los alimentos. <https://www.fao.org/food-safety/es/>

- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2020). Inocuidad de los alimentos.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2023). Buenas prácticas de manufactura (BPM).
<https://www.who.int>
- Orús, A. (2024). El sector lácteo en el mundo: Datos estadísticos. Statista.
<https://es.statista.com/temas/9459/el-sector-lacteo-en-el-mundo/#topFacts>
- Periago, M., Ross, M., Santaella, C., Pérez, D., García, F., & Santaella, J. (2008). Práctica 2 - Composición fisicoquímica de la leche. Universidad de Murcia.
<https://www.um.es/web/innovacion/plataformas/ocw/listado-de-cursos/higiene-inspeccion-y-control-alimentario/practicas/composicion-fisico-quimica>
- Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica. (2023). Exportación de productos lácteos. Procomer. <https://www.procomer.com>
- Reglamento Técnico Centroamericano. (2017). Industria de Alimentos y Bebidas Procesados. Buenas Prácticas de Manufactura. Principios Generales. Reglamento Técnico Centroamericano.
https://www.inapidte.ac.cr/pluginfile.php/14242/mod_resource/content/2/BPM%20R2/assets/rtca.pdf
- Ríos-Muñiz, D., Cerna-Cortés, J. F., Morán-García, N., Meza-Segura, M., & Estrada-García, T. (2019). Escherichia coli enterotoxigénica y enteroagregativa: Prevalencia, patogénesis y modelos muridos. Gaceta Médica de México, 155(4), 410-416.
- Rojas-Sánchez, E., Jiménez-Soto, M., Barquero-Calvo, E., Duarte-Martínez, F., Mollenkopf, D. F., Wittum, T. E., & Muñoz-Vargas, L. (2023). Prevalence Estimation, Antimicrobial Susceptibility, and Serotyping of Salmonella enterica Recovered from New World Non-Human Primates (Platyrrhini), Feed, and Environmental Surfaces from Wildlife Centers in Costa Rica. Antibiotics, 12(5), 844. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050844>
- Salas-Salvadó, Jordi, Babio, Nancy, Juárez-Iglesias, Manuela, Picó, Catalina, Ros, Emilio, & Moreno Aznar, Luís A. (2018). Importancia de los alimentos lácteos en la salud cardiovascular: ¿enteros o desnatados? Nutrición Hospitalaria, 35(6), 1479-1490.
<https://dx.doi.org/10.20960/nh.2353>
- SURDRY. (2023). Glosario Pasteurización. SURDRY Food Sterilizers. Recuperado 29 de mayo de 2023, de

<https://surdry.com/glossary/uht/0la,%2C%20magnesio%2C%20f%C3%B3sforo%20y%20zinc>.

- The Food Tech [TFT]. (2023). La inocuidad de los alimentos, ¿Qué es y por qué es importante? The Food Tech. <https://thefoodtech.com/seguridad-alimentaria/la-inocuidad-de-los-alimentos-que-es-y-por-que-es-importante/#:~:text=de%20los%20alimentos%3F-,La%20importancia%20de%20la%20inocuidad%20de%20los%20alimentos%20radica%20en,hepatitis%20A%2C%20c%C3%B3lera%20y%20salmonelosis>.
- Vásquez Mejía, Sandra Milena. (2021). El rol del médico veterinario y el zootecnista en la inocuidad de productos pecuarios. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 68(1), 9-10. Epub November 21, 2021. Recuperado el 1 de Junio, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-29522021000100009&lng=en&tlng=es
- Vázquez-Ojeda, E., Pérez-Morales, E., Hurtado-Ayala, L., & Alcántara-Jurado, L. (2014). Evaluación de la calidad microbiológica de la leche. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(3), 91-99.
- Velásquez V, Carlomagno, & Vega V, Jaime. (2012). Calidad de la leche y mastitis subclínica en establos de la provincia de Huaura, Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(1), 65-71. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172012000100008&lng=es&tlng=es.
- Villamil Jiménez, Luis C, & Romero Prada, Jaime R.. (2003). Retos y Perspectivas de la Salud Pública Veterinaria. *Revista de Salud Pública*, 5(2), 109-122. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-00642003000200001&lng=en&tlng=es.
- Zenebe, T., Zegeye, N. & Eguale, T. (2020). Prevalence of *Campylobacter* species in human, animal and food of animal origin and their antimicrobial susceptibility in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **19**, 61. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00405-8>

7. ANEXOS

Anexo 1: Determinación del recuento bacteriano en queso vegano y yogurt vegano.

Determination of the bacterial count in vegan cheese and vegan yogurt

The determination is carried out according to the official method L 00.00-88 "Horizontal method for the enumeration of microorganisms, colony counting method at 30 °C".

Protocol based on the:

1. En iso 6887-1:2017 (preparation of test samples and production of initial dilutions for microbiological testing of foodstuffs; part 1: general rules for the preparation of initial dilutions and decimal dilutions)
2. En 150 4833-1:2013 (horizontal method for the enumeration of microorganisms; part 1: colony enumeration at 30 °c by the cast plate method)

Day 1	<ol style="list-style-type: none"> 1. Place 10 g of the sample in a stomacher bag and fill up with 90 g nacl peptone (is already -1 dilution). <ol style="list-style-type: none"> a. Selected dilution levels: -1 to -9 2. Add 1 ml of each dilution level to an empty petri dish in duplicate. 3. Pour 12-15 ml plate count agar (pc agar) (< 50°C) into each petri dish within the next max. 45 minutes. Run sterile control at the same time! 4. Mix sample and agar thoroughly by rotating the petri dish and allow the agar to solidify. 5. Incubate the petri dishes with the lid down in the incubator at 30°C for 72h. 6. Put 0.33 ml of the dilution on 3 blood agar plates (3 plates per sample) to observe
Day 2	<ol style="list-style-type: none"> 1. Analysis of the 3 col s for each sample. If there is bacteria growing let them rest for 24 hours.
Day 3	<ol style="list-style-type: none"> 1. For the col s: do native, gram stain, oxidase and catalase.
Day 4	<ol style="list-style-type: none"> 1. Analysis of the pc plates for the total bacterial count.

Materials:

- Sterile test tubes/ stomacher bags + stomacher
- 10ml glass pipettes + pipetting aid/ sterile cutlery
- Pipettes/ pipetting aids + pipette tips/ glass pipettes (1000µl, 100µl)
- NaCl peptone tubes
- 18 Empty, sterile Petri dishes
- 270 ml plate count agar

Determinación del recuento bacteriano en queso vegano y yogurt vegano

La determinación se realiza según el método oficial L 00.00-88 "Método horizontal para la enumeración de microorganismos, método de recuento de colonias a 30 °C".

Protocolo basado en:

1. EN ISO 6887-1:2017 (Preparación de muestras de prueba y producción de diluciones iniciales para pruebas microbiológicas de productos alimenticios; Parte 1: Reglas generales para la preparación de diluciones iniciales y diluciones decimales)
2. EN 150 4833-1:2013 (Método horizontal para la enumeración de microorganismos; Parte 1: Enumeración de colonias a 30 °C por el método de placa fundida)

Día 1	<ol style="list-style-type: none">1. Coloque 10 g de la muestra en una bolsa estomacal y rellene con 90 g de peptona de NaCl (ya es -1 dilución).2. Niveles de dilución seleccionados: -1 a -93. Añada 1 ml de cada nivel de dilución a una placa de Petri vacía por duplicado.4. Vierta 12-15 ml de agar de recuento de placas (agar PC) (< 50 ° C) en cada placa de Petri dentro de los próximos 45 minutos como máximo. ¡Ejecute el control estéril al mismo tiempo!5. Mezcle bien la muestra y el agar girando la placa de Petri y deje que el agar se solidifique.6. Incubar las placas de Petri con la tapa bajada en la incubadora a 30°C durante 72 h.7. Poner 0,33 ml de la dilución en 3 placas de agar sangre (3 placas por muestra) para observar si hay presencia de Bacillus. Las placas se incubaron a 37 0C durante 24 horas
Día 2	<ol style="list-style-type: none">1. Análisis de los 3 COL S para cada muestra. Si hay bacterias creciendo, déjelas reposar durante 24 horas.
Día 3	<ol style="list-style-type: none">1. Para el COL S: Hacer nativo, tinción de Gram, oxidasa y catalasa.
Día 4	<ol style="list-style-type: none">1. Análisis de las placas de PC para el recuento bacteriano total

Materiales:

1. Tubos de ensayo estériles / bolsas de estómago + estómago
2. Pipetas de vidrio de 10 ml + ayuda para pipetear / cubiertos estériles
3. Pipetas/ auxiliares de pipeteo + puntas de pipeta/ pipetas de vidrio (1000 µl, 100 µl)
4. Tubos de peptona de NaCl
5. 18 Placas de Petri vacías y estériles
6. 270 ml de agar en placa

Anexo 2: L 00.00-133/2: Método horizontal para la detección y enumeración de *Enterobacteriaceae* en la comida

L 00.00-133/2: Horizontal method for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* in food

Part 2: Colony counting technique

Protocol based on the:

- EN ISO 6887-1:2017 (Preparation of test samples and production of initial dilutions for microbiological testing of foodstuffs; Part 1: General rules for the preparation of initial dilutions and decimal dilutions)

Day 1	<ol style="list-style-type: none"> 1. Put 10 g cheese into a stomacher bag and fill up with 90 g NaCl peptone (is already -1 dilution). 2. Prepare a decimal dilution to the desired dilution level 3. Dilution steps: -1 to -5 4. Add 1 ml of each dilution level to an empty Petri dish in duplicate. 5. Pour 15 ml of crystal violet neutral red bile glucose (VRBG) agar (44-47 °C) into each Petri dish within the next max. 15 minutes. Run the sterile control at the same time! 6. Mix the sample and agar thoroughly by rotating the Petri dish and allow the agar to solidify. 7. After complete solidification of the mixture, overlay it with about 5 ml to 10 ml of the crystal violet neutral red bile glucose (VRBG) agar to avoid growth by swarming and to achieve semi-anaerobic conditions. The plates are left to solidify as described above. 8. The petri dishes are incubated with the lid down in an incubator at 37°C for 24 hours.
Day 2	<ol style="list-style-type: none"> 1. Evaluation of the plates. 2. Collection of colonies for confirmation. These colonies are spread fractionally on a non-selective nutrient agar and incubated for 24 h at 37 °C.
Day 3	<ol style="list-style-type: none"> 1. Performing the oxidase test. 2. A colony is removed using a needle and transferred to a tube containing an OF glucose medium. This tube is now incubated for 24 h at 37 °C.
Day 4	<ol style="list-style-type: none"> 1. Evaluation of the glucose tube.

Materials:

- Sterile test tubes/ stomacher bags + stomacher
- 10ml glass pipettes + pipetting aid/ sterile cutlery
- Pipettes/ pipetting aids + pipette tips/ glass pipettes (1000µl, 100µl)
- NaCl peptone tubes
- 18 Empty, sterile Petri dishes
- 270ml + 180ml crystal violet neutral red bile glucose (VRBG) agar
- S1 agar
- Oxidase strips
- Glucose tubes

L 00.00-133/2: Método horizontal para la detección y enumeración de *enterobacterias* en alimentos

Parte 2: Técnica de conteo de colonias

Protocolo basado en:

- EN ISO 6887-1:2017 (Preparación de muestras de ensayo y producción de primeras diluciones para pruebas microbiológicas de productos alimenticios; Parte 1: Reglas generales para la preparación de diluciones iniciales y diluciones decimales)

Día 1	<ol style="list-style-type: none">1. Coloque 10 g de queso en una bolsa de estómago y rellene con 90 g de peptona de NaCl (ya es -1 dilución).2. Prepare una dilución decimal hasta el nivel de dilución deseado<ol style="list-style-type: none">a. Pasos de dilución: -1 a -53. Añada 1 ml de cada nivel de dilución a una placa de Petri vacía por duplicado.4. Vierta 15 ml de agar glucosa biliar roja neutra (VRBG) de color violeta cristalino (44-47 °C) en cada placa de Petri durante los siguientes 15 minutos como máximo. ¡Ejecute el control estéril al mismo tiempo!5. Mezcle bien la muestra y el agar girando la placa de Petri y deje que el agar se solidifique.6. Después de la solidificación completa de la mezcla, cúbrala con aproximadamente 5 ml a 10 ml de agar glucosa de bilis roja neutra (VRBG) de color violeta cristalino para evitar el crecimiento por enjambre y lograr condiciones semianaeróbicas. Las placas se dejan solidificar como se describió anteriormente.7. Las placas de Petri se incuban con la tapa hacia abajo en una incubadora a 37 °C durante 24 horas.
Día 2	<ol style="list-style-type: none">1. Evaluación de las placas.2. Recogida de colonias para confirmación. Estas colonias se distribuyen fraccionadamente en un agar nutriente no selectivo y se incuban durante 24 h a 37 °C.
Día 3	<ol style="list-style-type: none">1. Realización de la prueba de oxidasa.2. Se extrae una colonia con una aguja y se transfiere a un tubo que contiene un medio de glucosa OF. Este tubo se incuba ahora durante 24 h a 37 °C.
Día 4	<ol style="list-style-type: none">1. Evaluación del tubo de glucosa.

Materiales:

- Tubos de ensayo estériles / bolsas de estómago + estómago
- Pipetas de vidrio de 10 ml + ayuda para pipetear / cubiertos estériles
- Pipetas/ auxiliares de pipeteo + puntas de pipeta/ pipetas de vidrio (1000 µl, 100 µl)
- Tubos de peptona de NaCl
- 18 Placas de Petri vacías y estériles
- 270 ml + 180 ml de agar glucosa biliar roja neutra (VRBG) de color violeta cristal
- Agar S1
- Tiras de oxidasa
- Tubos de glucosa

Anexo 3: *Escherichia coli* β-glucuronidasa positiva en la comida

L 00.00-132/2: Horizontal method for the enumeration of β-glucuronidase-positive *Escherichia coli* in food

Part 2: Colony counting method at 44 °C with 5-bromo-4-chloro-3-Indol-beta-D-glucuronide

Protocol based on:

- EN ISO 6887-1:2017 (Preparation of test samples and production of initial dilutions for microbiological testing of foodstuffs; Part 1: General rules for the preparation of initial dilutions and decimal dilutions)
- DIN EN ISO 7218 (Microbiology of food and animal feeding stuff - General requirements and guidelines for microbiological testing)

WARNING Strains of *Escherichia coli* that show no growth at 44 °C, and in particular, strains that are β-glucuronidase negative, such as *Escherichia coli* 0157, are not detected.

Day 1	<ol style="list-style-type: none">1. Put 10 g cheese into a stomacher bag and fill up with 90 g NaCl peptone (is already -1 dilution).2. Prepare a decimal dilution to the desired dilution level<ol style="list-style-type: none">a. Dilution levels: -1 to -53. Add 1 ml of each dilution level to an empty Petri dish in duplicate.4. 15 ml TBX agar (44-47 °C) is poured into each Petri dish within 15 minutes. Run the sterile control at the same time!5. Mix the sample and agar thoroughly by rotating the Petri dish and allow the agar to solidify.6. Incubate the Petri dishes with the lid down in the incubator at 44°C for 18-24h.
Day 2	<ol style="list-style-type: none">1. Evaluation of the plates.<ul style="list-style-type: none">• Count characteristic colonies of β-glucuronidase-positive <i>Escherichia coli</i> in each Petri dish containing less than 150 characteristic colonies and less than 300 colonies in total (characteristic and non-characteristic).• Characteristic colony morphology for <i>Escherichia coli</i> on TBX agar: 2 - 5 mm, turquoise colonies or colonies with blue centre

Materials:

- Sterile test tubes/ stomacher bags + stomacher
- 10ml glass pipettes + pipetting aid/ sterile cutlery
- Pipettes/ pipetting aids + pipette tips/ glass pipettes (1000µl, 100µl)
- NaCl peptone tubes
- 10 empty, sterile Petri dishes
- 150ml TBX Agar

L 00.00-132/2: Método horizontal para la enumeración de *Escherichia coli* β-glucuronidasa positiva en alimentos

Parte 2: Método de recuento de colonias a 44 °C con 5-bromo-4-cloro-3-Indol-beta-D-glucurónico

Protocolo basado en:

EN ISO 6887-1:2017 (Preparación de muestras de ensayo y producción de primeras diluciones para pruebas microbiológicas de productos alimenticios; Parte 1: Reglas generales para la preparación de diluciones iniciales y diluciones decimales)

DIN EN ISO 7218 (Microbiología de los alimentos y de los piensos - Requisitos generales y directrices para las pruebas microbiológicas)

WARNING ADVERTENCIA No se detectan cepas de *Escherichia coli* que no muestren crecimiento a 44 °C y, en particular, cepas que sean β-glucuronidasa negativas, como *Escherichia coli* 0157.

Día 1	<ol style="list-style-type: none">1. Coloque 10 g de queso en una bolsa de estómago y rellene con 90 g de peptona de NaCl (ya es -1 dilución).2. Prepare una dilución decimal hasta el nivel de dilución deseado<ol style="list-style-type: none">1. Niveles de dilución: -1 a -53. Añada 1 ml de cada nivel de dilución a una placa de Petri vacía por duplicado.4. Se vierten 15 ml de agar TBX (44-47 °C) en cada placa de Petri en 15 minutos. ¡Ejecute el control estéril al mismo tiempo!5. Mezcle bien la muestra y el agar girando la placa de Petri y deje que el agar se solidifique.6. Incubar las placas de Petri con la tapa bajada en la incubadora a 44°C durante 18-24h..
Día 2	<ol style="list-style-type: none">1. Evaluación de las placas.<ul style="list-style-type: none">• Cuente las colonias características de <i>Escherichia coli</i> β-glucuronidasa positiva en cada placa de Petri que contenga menos de 150 colonias características y menos de 300 colonias en total (características y no características).• Morfología característica de la colonia de <i>Escherichia coli</i> en agar TBX: 2 - 5 mm, colonias turquesas o colonias con centro azul

Materiales:

1. Tubos de ensayo estériles / bolsas de estómago + estómago
2. Pipetas de vidrio de 10 ml + ayuda para pipetear / cubiertos estériles
3. Pipetas/ auxiliares de pipeteo + puntas de pipeta/ pipetas de vidrio (1000 µl, 100 µl)
4. Tubos de peptona de NaCl
5. 10 placas de Petri vacías y estériles
6. 150 ml de agar TBX

Anexo 4. L 00.00-20: Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella*

L 00.00-20: Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* Part 1: Detection of *Salmonella* spp.

Protocol based on, among others:

- DIN EN ISO 6579:2007-10 (Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002+Amd 1:2007); German version EN ISO 6579:2002+A1:2007)

Day 1	1. Place 25 g of cheese in a stomacher bag and fill up with 225 g of buffered peptone water at room temperature. Incubate the enrichment at 34-38 °C for 18 ± 2 hours.
Day 2	1. Transfer 0.1 ml of the enrichment into a culture tube containing 10 ml RVS broth and incubate at 41.5 °C for 24 ± 3 hours. 2. Transfer 1 ml of the enrichment into a culture tube containing 10 ml MKTTn broth and incubate at 34-38 °C for 24 ± 3 hours.
Day 3	1. Inoculate the surface of an XLD plate with the culture obtained in the RVS broth using a 10-ml inoculation loop so that well-separated individual colonies are formed. A Brilliance <i>Salmonella</i> plate is inoculated in the same way. 2. Inoculate the surface of an XLD plate with the culture obtained in the MKTTn broth using a 10-ml inoculation loop so that well-separated individual colonies are formed. A Brilliance <i>Salmonella</i> plate is inoculated in the same way. 3. Incubate the plates for 24 ± 3 hours at 34-38 °C. 4. Siempre realizar duplicados de cada placa.
Day 4	1. Suspicious colonies for <i>Salmonella</i> spp. on XLD agar: <ol style="list-style-type: none"> a. <i>Salmonella</i> colonies on XLD agar have a black colony centre and a slightly transparent reddish coloured zone due to the indicator colour change in the medium. 2. Suspicious colonies for <i>Salmonella</i> spp. on Brilliance <i>Salmonella</i> Agar: 1-2mm purple/pink colonies. Confirmation of suspicious colonies <ul style="list-style-type: none"> • For confirmation, selected colonies are spread on the surface of a CBA plate in such a way that individual colonies can develop well separated from each other. The inoculated plates are incubated for 24 ± 3 h at a temperature between 34 °C and 38 °C. • Caution! Pure cultures must be used for biochemical and serological confirmation. • Further tests: <ol style="list-style-type: none"> a. Serological examination b. Performance of an API

Materials:

- Sterile test tubes/ stomacher bags + stomacher
- 10ml glass pipettes + pipetting aid/ sterile cutlery
- Pipettes/ pipetting aids + pipette tips/ glass pipettes (1000µl, 100µl)
- 225 g buffered peptone water
- RVS broth (Rappaport-Vassiliadis medium with soy)
- MKTTn broth (Muller-Kauffmann tetrathionate novobiocin broth)
- XLD plates (xylose-lysine-deoxycholate agar)
- Brilliance *Salmonella* plates
- Columbia blood agar plates
- *Salmonella* API
- Saline solution
- *Salmonella* antisera

L 00.00-20: Método horizontal para la detección, enumeración y serotipificación de
Salmonella
Parte 1: Detección de *Salmonella* spp.

Protocolo basado, entre otros, en:

- DIN EN ISO 6579:2007-10 (Microbiología de alimentos y piensos - Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002+Amd 1:2007); Versión alemana EN ISO 6579:2002+A1:2007)

Día 1	1. Coloque 25 g de queso en una bolsa estomacal y llénela con 225 g de agua de peptona tamponada a temperatura ambiente. Incubar el enriquecimiento a 34-38 °C durante 18 ± 2 horas.
Día 2	1. Transfiera 0,1 ml del enriquecimiento a un tubo de cultivo que contenga 10 ml de caldo RVS e incube a 41,5 °C durante 24 ± 3 horas. 2. Transfiera 1 ml del enriquecimiento a un tubo de cultivo que contenga 10 ml de caldo MKTTn e incube a 34-38 °C durante 24 ± 3 horas.
Día 3	3. Inocular la superficie de una placa XLD con el cultivo obtenido en el caldo RVS utilizando un masa de inoculación de 10 l para que se formen colonias individuales bien separadas. De la misma manera, se inocula una placa de <i>Salmonella</i> Brilliance. 4. Inocular la superficie de una placa XLD con el cultivo obtenido en el caldo MKTTn utilizando un circuito de inoculación de 10m l para que se formen colonias individuales bien separadas. De la misma manera, se inocula una placa de <i>Salmonella</i> Brilliance. 5. Incubar las placas durante 24 ± 3 horas a 34-38 °C. 6. Siempre realizar duplicados de cada placa.
Día 4	Evaluación de las placas: 1. Colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp. en agar XLD: a. Las colonias de <i>Salmonella</i> en agar XLD tienen un centro de colonia negro y una zona de color rojizo ligeramente transparente debido al cambio de color del indicador en el medio. 2. Colonias sospechosas de <i>Salmonella</i> spp. en Brilliance <i>Salmonella</i> Agar: Colonias de 1-2 mm de color púrpura/rosa Confirmación de colonias sospechosas • Para confirmación, las colonias seleccionadas se extienden en la superficie de una placa CBA de tal manera que las colonias individuales pueden desarrollarse bien separadas unas de otras. Las placas inoculadas se incuban durante 24 ± 3 h a una temperatura entre 34 °C y 38 °C. • ¡Cautela! Se deben utilizar cultivos puros para la confirmación bioquímica y serológica. • Otras pruebas: b. Examen serológico c. Rendimiento de una API

Materiales:

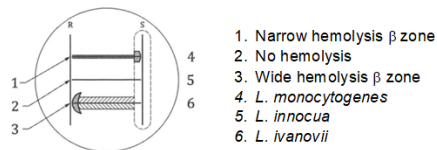
1. Tubos de ensayo estériles / bolsas de estómago + estómago
2. Pipetas de vidrio de 10 ml + ayuda para pipetear / cubiertos estériles
3. Pipetas/ auxiliares de pipeteo + puntas de pipeta/ pipetas de vidrio (1000 µl, 100 µl)
4. 225 g de agua de peptona tamponada
5. Caldo RVS (medio Rappaport-Vassiliadis con soja)
6. Caldo MKTTn (Caldo de novobiocina tetrionato de Müller-Kauffmann)
7. Placas XLD (agar xilosa-lisina-desoxicolato)
8. Placas Brilliance *Salmonella*
9. Placas de agar sangre Columbia
10. API de *Salmonella*
11. Solución salina
12. *Salmonella* antisueros

Anexo 5: L 00.00-32/1: Método horizontal para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp.*

L 00.00-32/1: Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and *Listeria spp.* Part 1: Detection method

Adoption of DIN EN ISO 11290-2, September 2017													
<ul style="list-style-type: none"> Run control plate with <i>L. monocytogenes</i>! 													
Day 1	1. 25 g of the sample are placed in a stomacher bag, filled with 225 ml of room temperature Half-fraser broth, homogenized [230 rpm, 30 s] and incubated at 30°C for 25 h.												
Day 2	<ol style="list-style-type: none"> 0.1 ml of the enriched, incubated Half-fraser broth is transferred to 10 ml Fraser broth and incubated at 37°C for 24 hours. The surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate is inoculated with the Half-fraser broth using an eyelet so that well-separated individual colonies are formed and incubated at 37°C for 48h (check after 24-48h). The same procedure is repeated for the Palcam plates. Mezclar las bolsas antes de comenzar. 												
Day 3	1. The surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate is inoculated with the Fraser broth using an eyelet so that well separated individual colonies are formed and incubated at 37°C for 48h (check after 24-48h). The same procedure is repeated for the Palcam plates.												
Day 4	1. Evaluation of the Half-fraser plates.												
Day 5	<ol style="list-style-type: none"> Evaluation of the Fraser plates. <p>Confirmation of suspicious colonies</p> <ol style="list-style-type: none"> Suspicious colonies on <i>Listeria</i> Brilliance Agar: <ol style="list-style-type: none"> Presumptive <i>L. monocytogenes</i> and <i>L. ivanovii</i>: blue-green colonies with opaque halo Presumptive <i>Listeria spp.</i>: blue-green colonies with or without opaque halo Suspicious colony on Palcam agar: <ol style="list-style-type: none"> <i>L. monocytogenes</i>: dimpled brown/black coloured colonies with black halo <ol style="list-style-type: none"> Remove at least one suspect colony (<i>L. monocytogenes</i>) from the agar and spread fractionally as a pure culture on Columbia blood agar and incubate at 37 °C for 18-24 hours. Further confirmatory tests can be performed: <table border="1" data-bbox="587 1183 1136 1365"> <thead> <tr> <th>Optional confirmatory tests for <i>L. monocytogenes</i></th> <th>Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>a) Microscopic appearance</td> <td>Thin, short or coccoid rods</td> </tr> <tr> <td>b) Beta-hemolysis</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>c) Catalase</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>d) Mobility test</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>e) CAMP test</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table> <ol style="list-style-type: none"> Suspicious colonies are confirmed with the MALDI at the end. <ol style="list-style-type: none"> Microscopic appearance <ul style="list-style-type: none"> A microscopic preparation (e.g. Gram stain, wet microscopy) is made with a well-isolated colony. <i>Listeria spp.</i> (including <i>L. monocytogenes</i>) are Gram-positive (when this stain is performed), thin, short or coccoid rods, with staggering movement when obtained from a fresh culture. Haemolysis on blood agar <ul style="list-style-type: none"> An isolated colony is taken with an inoculation wire and then the surface of the agar is inoculated with it by pricking. This procedure is repeated for each culture. If possible, positive (<i>L. monocytogenes</i>) and negative (<i>L. innocua</i>) control cultures are inoculated on the same plate. After 24 h + 2 h incubation at 37 °C (6.3), the test strains and controls are analyzed. <ul style="list-style-type: none"> <i>L. monocytogenes</i> shows narrow, clear, light-colored hemolysis zones. <i>L. innocua</i> shows no clear zone around the puncture. <i>L. seeligeri</i> usually shows a weak hemolysis zone. <i>L. ivanovii</i> generally shows broad, clearly marked hemolysis zones. The plates are examined in bright light to compare the cultures of the test strains with the controls. Catalase <ul style="list-style-type: none"> To examine the catalase reaction, colony material is placed on a microscope slide and mixed with a drop of hydrogen peroxide. A positive reaction is indicated by the formation of gas bubbles. Caution! It must be considered that the catalase reaction can lead to a false positive result with a colony originating from a blood agar. Mobility test <ul style="list-style-type: none"> For motility testing, some material from an isolated colony obtained from a non-selective agar is diluted in sterilized water (or other suitable diluent) using an inoculation needle. <i>Listeria spp.</i> (including <i>L. monocytogenes</i>) appears as thin short rods with a staggering movement. CAMP-Test 	Optional confirmatory tests for <i>L. monocytogenes</i>	Results	a) Microscopic appearance	Thin, short or coccoid rods	b) Beta-hemolysis	+	c) Catalase	+	d) Mobility test	+	e) CAMP test	+
Optional confirmatory tests for <i>L. monocytogenes</i>	Results												
a) Microscopic appearance	Thin, short or coccoid rods												
b) Beta-hemolysis	+												
c) Catalase	+												
d) Mobility test	+												
e) CAMP test	+												

- If the result of the hemolysis test is difficult to interpret, the CAMP test is recommended to clearly demonstrate that the hemolysis is due to listeriolysin activity.
- A β -hemolytic strain of *Staphylococcus aureus* and a strain of *Rhodococcus equi* are required to perform the CAMP test. Not all strains of *S. aureus* are suitable for the CAMP test.
- The cultures of *S. aureus* and *R. equi* are spread in individual lines over the blood agar plate so that the two cultures are parallel and diametrically opposed. This requires a thin, even inoculation line. This can be achieved by using an inoculation loop or inoculation wire held at right angles to the agar.
- A well-isolated colony of the test strain is spread in the same way at right angles to these cultures in such a way that the test culture and the cultures of *S. aureus* and *R. equi* do not touch but are about 1 mm to 2 mm apart where they are closest to each other.
- Several test strains may be spread on the same plate.



Inoculation and evaluation of CAMP test plates

- The vertical lines in Figure 1 represent smears of *S. aureus* (S) and *R. equi* (R). Horizontal lines represent smears of the test cultures. Hatched areas show the sites of increased hemolysis. The dashed areas show zones of influence of the *S. aureus* culture.
- At the same time, control cultures of *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *L. ivanovii* are smeared.
- When using blood agar, the plates are incubated for 18 h to 24 h at 37 °C.
- In the positive reaction with *R. equi*, a broad (5 mm to 10 mm) arrow-head hemolysis zone is formed. The reaction is considered negative if a narrow zone of weak hemolysis extends only about 1 mm from the test strain in the diffusion zone of the *R. equi* culture.
- A positive reaction with *S. aureus* appears as a small zone of increased hemolysis extending only about 2 mm from the test strain within the weak hemolytic zone formed by the growth of the culture of *S. aureus*. No large zones of hemolysis occur around the culture of *S. aureus* and *L. monocytogenes*.

Materials:

- Stomacher bag + Stomacher
- Scale
- 1ml glass pipettes + pipetting aid
- Inoculation loops (10 μ l)
- Sterile spatula
- Microscope slides + coverslips
- 225ml Half-fraser broth
- 10ml Fraser broth
- 2 *Listeria* Brilliance plates
- 2 Palcam plates
- Columbia blood agar
- Gram stain
- Sodium chloride solution or similar solution
- Hydrogen peroxide

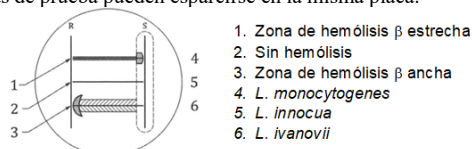
L 00.00-32/1: Método horizontal para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. Parte 1: Método de detección

Adopción de la norma DIN EN ISO 11290-2, septiembre de 2017

- ¡Ejecutar en la placa de control con *L. monocytogenes*!

Día 1	1. Se colocan 25 g de la muestra en una bolsa estomacal, se llenan con 225 ml de caldo Half-fraser a temperatura ambiente, se homogeneizan [230 rpm, 30 s] y se incuban a 30 °C durante 25 h.												
Día 2	1. 0,1 ml del caldo Half-fraser enriquecido e incubado se transfiere a 10 ml de caldo Fraser y se incuban a 37 °C durante 24 horas. 2. La superficie de una placa de Listeria Brilliance se inocula con el caldo Half-fraser mediante un ojal para formar colonias individuales bien separadas y se incuban a 37 °C durante 48 h (comprobar después de 24-48 h). El mismo procedimiento se repite para las placas Palcam. 3. Mezclar las bolsas antes de comenzar.												
Día 3	1. La superficie de una placa de Listeria Brilliance se inocula con el caldo Fraser mediante un ojal para que se formen colonias individuales bien separadas y se incuban a 37 °C durante 48 h (verificar después de 24-48 h). El mismo procedimiento se repite para las placas Palcam.												
Día 4	1. Evaluación de las placas Half-fraser.												
Día 5	1. Evaluación de las placas Fraser. Confirmación de colonias sospechosas: 1. Colonias sospechosas en Listeria Brilliance Agar: a. Presuntas <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. ivanovii</i> : colonias de color verde azulado con halo opaco b. Presunta <i>Listeria</i> spp.: colonias de color azul verdoso con o sin halo opaco 2. Colonia sospechosa en agar Palcam: a. <i>L. monocytogenes</i> : colonias de color marrón/negro con hoyuelos y halo negro 1. Retirar al menos una colonia sospechosa (<i>L. monocytogenes</i>) del agar y extenderla fraccionalmente como un cultivo puro en agar sangre Columbia e incubar a 37 °C durante 18-24 horas. 2. Se pueden realizar otras pruebas confirmatorias: <table border="1" style="margin-left: 40px;"> <thead> <tr> <th>Pruebas confirmatorias opcionales para <i>L. monocytogenes</i></th> <th>Resultados</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>a) Aspecto microscópico</td> <td>Varillas delgadas, cortas o cocoides.</td> </tr> <tr> <td>b) Beta-hemólisis</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>c) Catalasa</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>d) Prueba de movilidad</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>e) Prueba CAMP</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table> 3. Las colonias sospechosas se confirman con el MALDI al final. a) Aspecto microscópico • Se realiza una preparación microscópica (por ejemplo, tinción de Gram, microscopía húmeda) con una colonia bien aislada. 1. <i>Las Listeria</i> spp. (incluyendo <i>L. monocytogenes</i>) son bacilos Gram-positivos (cuando se realiza esta tinción), delgados, cortos o cocoides, con un movimiento asombroso cuando se obtienen de un cultivo fresco. b) Hemólisis en agar sangre 1. Se toma una colonia aislada con un alambre de inoculación y luego se inocula la superficie del agar con él mediante punción. Este procedimiento se repite para cada cultivo clínico. Si es posible, se inoculan cultivos de control positivos (<i>L. monocytogenes</i>) y negativos (<i>L. innocua</i>) en la misma placa. 2. Después de 24 h + 2 h de incubación a 37 °C (6,3), se analizan las cepas de prueba y los controles. o <i>L. monocytogenes</i> muestra zonas de hemólisis estrechas, claras y de color claro o <i>L. innocua</i> no muestra una zona clara alrededor de la punción o <i>L. seeligeri</i> suele mostrar una zona de hemólisis débil o <i>L. ivanovii</i> generalmente muestra zonas de hemólisis anchas y claramente marcadas 3. Las placas se examinan con luz brillante para comparar los cultivos de las cepas de prueba con los controles. c) Catalasa 1. Para examinar la reacción de la catalasa, el material de la colonia se coloca en un portaobjetos de microscopio y se mezcla con una gota de peróxido de hidrógeno. Una reacción positiva está indicada por la formación de burbujas de gas. 2. ¡Cautela! Hay que tener en cuenta que la reacción de la catalasa puede dar lugar a un resultado falso positivo con una colonia procedente de un agar sangre. d) Prueba de motilidad 1. Para las pruebas de motilidad, parte del material de una colonia aislada obtenido de un agar no selectivo se diluye en agua esterilizada (u otro diluyente adecuado) utilizando una aguja de inoculación. 2. <i>Listeria</i> spp. (incluyendo <i>L. monocytogenes</i>) aparecen como bacilos delgados y cortos con un movimiento asombroso. e) CAMPO-Prueba	Pruebas confirmatorias opcionales para <i>L. monocytogenes</i>	Resultados	a) Aspecto microscópico	Varillas delgadas, cortas o cocoides.	b) Beta-hemólisis	+	c) Catalasa	+	d) Prueba de movilidad	+	e) Prueba CAMP	+
Pruebas confirmatorias opcionales para <i>L. monocytogenes</i>	Resultados												
a) Aspecto microscópico	Varillas delgadas, cortas o cocoides.												
b) Beta-hemólisis	+												
c) Catalasa	+												
d) Prueba de movilidad	+												
e) Prueba CAMP	+												

1. Si el resultado de la prueba de hemólisis es difícil de interpretar, se recomienda la prueba CAMP para demostrar claramente que la hemólisis se debe a la actividad de la listeriolisina.
2. Se requiere una cepa β -hemolítica de *Staphylococcus aureus* y una cepa de *Rhodococcus equi* para realizar la prueba CAMP. No todas las cepas de *S. aureus* son adecuadas para la prueba CAMP.
3. Los cultivos de *S. aureus* y *R. equi* se distribuyen en líneas individuales sobre la placa de agar sangre, de modo que los dos cultivos son paralelos y diametralmente opuestos. Esto requiere una línea de inoculación delgada y uniforme. Esto se puede lograr mediante el uso de un circuito de inoculación o un alambre de inoculación sostenido en ángulo recto con el agar.
4. Una colonia bien aislada de la cepa de ensayo se propaga de la misma manera en ángulo recto con estos cultivos, de tal manera que el cultivo de ensayo y los cultivos de *S. aureus* y *R. equi* no se tocan, sino que están separados entre 1 mm y 2 mm entre sí, donde están más cerca unos de otros.
5. Varias cepas de prueba pueden esparcirse en la misma placa.



Inoculación y evaluación de las placas de prueba CAMP

1. Las líneas verticales de la Figura 1 representan frotis de *S. aureus* (S) y *R. equi* (R). Las líneas horizontales representan los frotis de los cultivos de prueba. Las áreas sombreadas muestran los sitios de aumento de la hemólisis. Las áreas discontinuas muestran zonas de influencia del cultivo *S. aureus*.
2. Al mismo tiempo, se frota los cultivos control de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii*.
3. Cuando se utiliza agar sangre, las placas se incuban durante 18 h a 24 h a 37 °C.
4. En la reacción positiva con *R. equi*, se forma una amplia zona de hemólisis en punta de flecha (5 mm a 10 mm). La reacción se considera negativa si una zona estrecha de hemólisis débil se extiende sólo alrededor de 1 mm de la deformación de prueba en la zona de difusión del cultivo de *R. equi*.
5. Una reacción positiva con *S. aureus* aparece como una pequeña zona de hemólisis aumentada que se extiende solo unos 2 mm desde la cepa de prueba dentro de la zona hemolítica débil formada por el crecimiento del cultivo de *S. aureus*. No se producen grandes zonas de hemólisis alrededor del cultivo de *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

Materials:

1. Bolsa Stomacher + Stomacher
2. Escama
3. Pipetas de vidrio de 1 ml + auxiliar de pipeteo
4. Asas de inoculación (10 μ l)
5. Espátula estéril
6. Portaobjetos de microscopio + cubreobjetos
7. 225 ml de caldo de medio engorde
8. 10 ml de caldo Fraser
9. 2 placas *Listeria* Brilliance
10. 2 placas Palcam
11. Agar sangre Columbia
12. Tinción de Gram
13. Solución de cloruro de sodio o solución similar
14. Peróxido de hidrógeno

Anexo 6: Prueba de desafío del yogurt

Challenge-Yogurt Test																																									
Day 1 Friday	<p><i>Cultivation of cryocultures for the inoculate</i></p> <ol style="list-style-type: none"> For the strain cocktail, fractionate 1 bead of a cryoculture (-80°C) of the selected strains onto Columbia blood agar with sheep blood. Incubate at 37°C for 24 hours. <ul style="list-style-type: none"> Stripped strains: <table border="1" style="margin-left: 40px;"> <thead> <tr> <th colspan="2" style="text-align: center;"><i>L. innocua</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>DSM 20649 (bovine brain)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">B</td> <td><i>Listeria innocua</i> IV 2.1 (Salat rice)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">C</td> <td><i>Listeria innocua</i> 146 (Zoonosen AG)</td> </tr> </tbody> </table> 	<i>L. innocua</i>		A	DSM 20649 (bovine brain)	B	<i>Listeria innocua</i> IV 2.1 (Salat rice)	C	<i>Listeria innocua</i> 146 (Zoonosen AG)																																
<i>L. innocua</i>																																									
A	DSM 20649 (bovine brain)																																								
B	<i>Listeria innocua</i> IV 2.1 (Salat rice)																																								
C	<i>Listeria innocua</i> 146 (Zoonosen AG)																																								
Day 4 Monday	<p><i>Pre-enrichment and growth phase of the inoculate</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Remove fresh colony material from each strain with an inoculation loop and transfer to 10 ml of BHI and incubate stationery at 37°C for 24 h. 																																								
Day 5 Tuesday	<p><i>Control of the final inoculate and inoculation of the samples</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Control the density of the incubated strains using a McFa device. Time: <table border="1" style="margin-left: 40px;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Lot/Strain</th> <th style="text-align: center;">McFa-Wert</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">B</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">C</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> Check that the logs have the same density. If in doubt, the suspensions must be diluted 1:10 (1 ml suspension, 9 ml NaCl peptone). A rule of three can be used to evaluate how much volume we need from each trunk. Then pour the individual stems together, mix well and create the stem cocktail. The stock cocktail is subsequently diluted and plated to ensure that it truly contains Log 9. Dilution levels: 7, 8, 9. Incubation 37°C, 24 h. <p><i>Inoculation of the yogurt</i></p> <ol style="list-style-type: none"> The yogurt is divided into a total of 4 batches (500g) of 100g Stomacher bags (20 Stomacher bags in total). <table border="1" style="margin-left: 40px; width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Cow</th> <th style="text-align: center;">T0</th> <th style="text-align: center;">T3</th> <th style="text-align: center;">T7</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>List.-quant.</td> <td>3 inoculated bags</td> <td>1 inoculated bag</td> <td>1 inoculated bag</td> </tr> <tr> <td>List.-qual. GKZ</td> <td>1 non-inoculated bag</td> <td></td> <td>1 non-inoculated bag</td> </tr> <tr> <td>Techno</td> <td>1 non-inoculated bag</td> <td>1 non-inoculated bag</td> <td>1 non-inoculated bag</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="margin-left: 40px; width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Soja</th> <th style="text-align: center;">T0</th> <th style="text-align: center;">T3</th> <th style="text-align: center;">T7</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>List.-quant.</td> <td>3 inoculated bags</td> <td>1 inoculated bag</td> <td>1 inoculated bag</td> </tr> <tr> <td>List.-qual. GKZ</td> <td>1 non-inoculated bag</td> <td></td> <td>1 non-inoculated bag</td> </tr> <tr> <td>Techno</td> <td>1 non-inoculated bag</td> <td>1 non-inoculated bag</td> <td>1 non-inoculated bag</td> </tr> </tbody> </table> 100g cow's milk yoghurt or 100g soy yoghurt are filled into each of the stomach maker bags. The batches that should contain <i>Listeria</i> are subsequently inoculated. An initial concentration of 102 CFU/g should be achieved. For this purpose, the stock cocktail is diluted down to -4 in a decimal dilution series. Then add 100 μl of the -4 dilution to the Stomacher bags. The inoculated quantity is stoked at 230 rpm for 1 min in order to achieve an even distribution of the inoculate. The bags that do not contain <i>Listeria</i> are mixed with 100 μl NaCl peptone (the dilution medium) and also stoked at 230 rpm for 1 minute in order to achieve an even distribution of the inoculate. The bags are stored in the refrigerator at 6 °C for the upcoming examination points. <p><i>Determination of the total number of bacteria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Place 10 g of the sample in a Stomacher bag and fill with 90 g of NaCl peptone (this is already -1 dilution). <ol style="list-style-type: none"> Selected dilution levels: -2 to -7 Add 1ml of each dilution level to an empty Petri dish in duplicate. Within the next max. 45 minutes, 12-15ml Plate Count Agar (PC Agar) (< 50°C) is poured into each Petri dish. Follow the sterile check! Mix the sample and agar carefully by rotating the Petri dish and allow the agar to solidify. The Petri dishes are incubated with the lid down in the incubator at 30°C for 72 hours. <p><i>Quantitative Listeria analysis</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Place 25 g of the sample in a Stomacher bag and fill with 225 g of NaCl peptone (this is already -1 dilution). Make a decimal dilution to the desired dilution level; Dilution medium: NaCl peptone water <ol style="list-style-type: none"> Dilution levels: 0 (3x 0.33ml), -1, -2 	Lot/Strain	McFa-Wert	A		B		C		Cow	T0	T3	T7	List.-quant.	3 inoculated bags	1 inoculated bag	1 inoculated bag	List.-qual. GKZ	1 non-inoculated bag		1 non-inoculated bag	Techno	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag	Soja	T0	T3	T7	List.-quant.	3 inoculated bags	1 inoculated bag	1 inoculated bag	List.-qual. GKZ	1 non-inoculated bag		1 non-inoculated bag	Techno	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag
Lot/Strain	McFa-Wert																																								
A																																									
B																																									
C																																									
Cow	T0	T3	T7																																						
List.-quant.	3 inoculated bags	1 inoculated bag	1 inoculated bag																																						
List.-qual. GKZ	1 non-inoculated bag		1 non-inoculated bag																																						
Techno	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag																																						
Soja	T0	T3	T7																																						
List.-quant.	3 inoculated bags	1 inoculated bag	1 inoculated bag																																						
List.-qual. GKZ	1 non-inoculated bag		1 non-inoculated bag																																						
Techno	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag																																						

	<p>3. 0.1ml of the selected dilution levels are added to each Listeria Brilliance plate in duplicate. The original sample (in the case of cheese, a sample directly from the stomacher bag) is divided into 3 plates of 0,333 ml each to increase the detection limit.</p> <p>4. The plates are placed with the lid down in the incubator at 37°C for 48h (check after 24h & 48h).</p> <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <p>1. 25 g of the sample are placed in a Stomacher bag, filled with 225 ml of room temperature half-Fraser broth, homogenized [230rpm, 30s] and incubated at 30°C for 25h.</p> <p><i>Technological studies (with the non-inoculated samples)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Determination of pH value • Determination of the aw value
Day 6 Wednesday	<p><i>Quantitative analysis of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluation of the quantitative Listeria Brilliance plates. <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <p>1. 0.1ml of the enriched, incubated half Fraser broth is transferred to 10ml Fraser broth and incubated at 37°C for 24 hours.</p> <p>2. The half Fraser broth is then inoculated onto the surface of a Listeria Brilliance plate using an eyelet so that well-defined individual colonies are created and incubated at 37°C for 48 hours (check after 24-48 hours). The same is repeated for the Palcam plates.</p>
Day 7 Thursday	<p><i>Quantitative analysis of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluation of the quantitative Listeria Brilliance plates. <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • The Fraser broth is inoculated onto the surface of a Listeria Brilliance plate using an eyelet so that well-defined individual colonies are created and incubated at 37°C for 48 hours (check after 24-48 hours). The same is repeated for the Palcam plates.
Day 8 Friday	<p><u>Probe T₀</u></p> <p><i>Determination of the total number of bacteria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluation of the PC plates for the total number of bacteria. <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluation of the half-Fraser plates <p><u>Probe T₃</u></p> <p><i>Quantitative analysis of listeria</i></p> <p>1. Place 25 g of the sample in a Stomacher bag and fill with 225 g of NaCl peptone (this is already -1 dilution). The same Stomacher bag and the same dilution series can be used to determine the total number of bacteria.</p> <p>2. Make a decimal dilution to the desired dilution level; Dilution medium: NaCl peptone water</p> <p>a. Dilution levels: 0 (3x 0.33ml), -1, -2, -3</p> <p>3. 0.1ml of the selected dilution levels are added to each Listeria Brilliance plate in duplicate. The original sample (in the case of cheese, a sample directly from the stomacher bag) is divided into 3 plates of 333 µl each to increase the detection limit.</p> <p>4. The plates are placed with the lid down in the incubator at 37°C for 48h (check after 24h & 48h). (Use of the cooled incubator)</p> <p><i>Technological studies (with the non-inoculated samples)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Determination of pH value • Determination of the aw value
Day 11 Monday	<p><u>Probe T₀</u></p> <p><i>Qualitative evaluation of listeria (sample from T₀)</i></p> <p>1. Evaluation of the Fraser plates</p> <p><u>Probe T₃</u></p> <p><i>Quantitative analysis of listeria</i></p> <p>1. Evaluation of the quantitative Listeria Brilliance plates.</p>
Day 12 Tuesday	<p><u>Probe T₇</u></p> <p><i>Determination of the total number of bacteria</i></p> <p>1. Place 10 g of the sample in a Stomacher bag and fill with 90 g of NaCl peptone (this is already -1 dilution).</p> <p>a. Selected dilution levels: -1 to -7</p> <p>2. Add 1ml of each dilution level to an empty Petri dish in duplicate.</p> <p>3. Within the next max. 45 minutes, 12-15ml Plate Count Agar (PC Agar) (< 50°C) is poured into each Petri dish. Follow the sterile check!</p> <p>4. Mix the sample and agar carefully by rotating the Petri dish and allow the agar to solidify.</p> <p>5. The Petri dishes are incubated with the lid down in the incubator at 30°C for 72 hours.</p> <p><i>Quantitative Listeria analysis</i></p> <p>1. Place 25 g of the sample in a Stomacher bag and fill with 225 g of NaCl peptone (this is already -1 dilution). The same Stomacher bag and the same dilution series can be used to determine the total number of bacteria.</p> <p>2. Make a decimal dilution to the desired dilution level; Dilution medium: NaCl peptone water</p> <p>a. Dilution levels: 0 (3x 0.33ml), -1, -2, -3</p> <p>3. 0.1ml of the selected dilution levels are added to each Listeria Brilliance plate in duplicate. The original sample (in the case of cheese, a sample directly from the stomacher bag) is divided into 3 plates of 333 µl each to increase the detection limit.</p> <p>4. The plates are placed with the lid down in the incubator at 37°C for 48h (check after 24h & 48h).</p> <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <p>1. 25 g of the sample are placed in a Stomacher bag, filled with 225 ml of room temperature half-Fraser broth, homogenized [230rpm, 30s] and incubated at 30°C for 25h.</p> <p><i>Technological studies (with the non-inoculated samples)</i></p>

	<ul style="list-style-type: none"> • Determination of pH value • Determination of the aw value
Day 13 Wednesday	<p><u>Probe T₇</u> <i>Quantitative analysis of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluation of the quantitative Listeria Brilliance plates. <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 0.1ml of the enriched, incubated half Fraser broth is transferred to 10ml Fraser broth and incubated at 37°C for 24 hours. 2. The half Fraser broth is then inoculated onto the surface of a Listeria Brilliance plate using an eyelet so that well-defined individual colonies are created and incubated at 37°C for 48 hours (check after 24-48 hours). The same is repeated for the Palcam plates.
Day 14 Thursday	<p><u>Probe T₇</u> <i>Quantitative analysis of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluation of the quantitative Listeria Brilliance plates. <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • The Fraser broth is inoculated onto the surface of a Listeria Brilliance plate using an eyelet so that well-defined individual colonies are created and incubated at 37°C for 48 hours (check after 24-48 hours). The same is repeated for the Palcam plates.
Day 15 Friday	<p><u>Probe T₇</u> <i>Determination of the total number of bacteria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluation of the PC plates for the total number of bacteria. <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluation of the half-Fraser plates
Day 18 Monday	<p><u>Probe T₇</u> <i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluation of the Fraser plates

Prueba de desafío del yogurt

Día 1 Viernes	<p><i>Cultivo de criocultivos para el inoculado</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Para el cóctel de cepas, fraccionar 1 gota de criocultivo (-80 °C) de las cepas seleccionadas en agar sangre Columbia con sangre de oveja. Incubar a 37°C durante 24 horas. <ul style="list-style-type: none"> Cepas libres: <table border="1" style="margin-left: 20px; width: 100%;"> <tr><td style="width: 5%;"></td><td style="text-align: center;"><i>L. innocua</i></td></tr> <tr><td>A</td><td>DSM 20649 (cerebro bovino)</td></tr> <tr><td>B</td><td><i>Listeria innocua</i> IV 2.1 (arroz salat)</td></tr> <tr><td>C</td><td><i>Listeria innocua</i> 146 (Zoonosis AG)</td></tr> </table> 		<i>L. innocua</i>	A	DSM 20649 (cerebro bovino)	B	<i>Listeria innocua</i> IV 2.1 (arroz salat)	C	<i>Listeria innocua</i> 146 (Zoonosis AG)																																																		
	<i>L. innocua</i>																																																										
A	DSM 20649 (cerebro bovino)																																																										
B	<i>Listeria innocua</i> IV 2.1 (arroz salat)																																																										
C	<i>Listeria innocua</i> 146 (Zoonosis AG)																																																										
Día 4 Lunes	<p><i>Fase de pre-enriquecimiento y crecimiento del inoculado</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Retire el material fresco de la colonia de cada cepa con un circuito de inoculación y transfíralo a 10 ml de BHI e incube la papelería a 37 °C durante 24 h. 																																																										
Día 5 Martes	<p><i>Control de la inoculación final e inoculación de las muestras</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Controle la densidad de las cepas incubadas mediante un dispositivo McFa. Hora: <table border="1" style="margin-left: 20px; width: 100%;"> <thead> <tr><th style="width: 50%;">Lote/Cepa</th><th style="width: 50%;">McFa-Wert</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td style="text-align: center;">A</td><td></td></tr> <tr><td style="text-align: center;">B</td><td></td></tr> <tr><td style="text-align: center;">C</td><td></td></tr> </tbody> </table> Compruebe que los registros tengan la misma densidad. En caso de duda, las suspensiones deben diluirse 1:10 (1 ml de suspensión, 9 ml de peptona de NaCl). Se puede usar una regla de tres para evaluar cuánto volumen necesitamos de cada tronco. A continuación, vierta los tallos individuales, mezcle bien y cree el cóctel de tallos. Posteriormente, el cóctel de caldo se diluye y se coloca en los platos para garantizar que realmente contenga Log 9. Niveles de dilución: 7, 8, 9. Incubación 37°C, 24 h. <p><i>Inoculación del yogur</i></p> <ol style="list-style-type: none"> El yogur se divide en un total de 4 lotes (500 g) de bolsas Stomacher de 100 g (20 bolsas Stomacher en total). <table border="1" style="margin-left: 20px; width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr><th style="width: 15%;"></th><th style="width: 25%;">Vaca</th><th style="width: 25%;">T0</th><th style="width: 25%;">T3</th><th style="width: 25%;">T7</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>List.-cuant.</td><td>3 bolsas inoculadas</td><td>1 bolsa inoculada</td><td>1 bolsa inoculada</td><td>1 bolsa inoculada</td></tr> <tr><td>List.-cual.</td><td>1 bolsa no inoculada</td><td></td><td></td><td>1 bolsa no inoculada</td></tr> <tr><td>GKZ</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Tecno</td><td>1 bolsa no inoculada</td><td>1 bolsa no inoculada</td><td>1 bolsa no inoculada</td><td>1 bolsa no inoculada</td></tr> </tbody> </table> <table border="1" style="margin-left: 20px; width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr><th style="width: 15%;"></th><th style="width: 25%;">Soja</th><th style="width: 25%;">T0</th><th style="width: 25%;">T3</th><th style="width: 25%;">T7</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>List.-cuant.</td><td>3 bolsas inoculadas</td><td>1 bolsa inoculada</td><td>1 bolsa inoculada</td><td>1 bolsa inoculada</td></tr> <tr><td>List.-cual.</td><td>1 bolsa no inoculada</td><td></td><td></td><td>1 bolsa no inoculada</td></tr> <tr><td>GKZ</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Tecno</td><td>1 bolsa no inoculada</td><td>1 bolsa no inoculada</td><td>1 bolsa no inoculada</td><td>1 bolsa no inoculada</td></tr> </tbody> </table> 100 g de yogur de leche de vaca o 100 g de yogur de soja se llenan en cada una de las bolsas de la máquina para hacer el estómago. Los lotes que deben contener <i>Listeria</i> se inoculan posteriormente. Se debe alcanzar una concentración inicial de 102 UFC/g. Para ello, el cóctel de caldo se diluye hasta -4 en una serie de diluciones decimales. A continuación, añada 100 μl de la dilución -4 a las bolsas Stomacher. La cantidad inoculada se alimenta a 230 rpm durante 1 minuto para lograr una distribución uniforme del inoculado. Las bolsas que no contienen <i>Listeria</i> se mezclan con 100 μl de peptona de NaCl (el medio de dilución) y también se alimentan a 230 rpm durante 1 minuto para lograr una distribución uniforme de la inoculación. Las bolsas se almacenan en el refrigerador a 6 °C para los próximos puntos de examen. <p><i>Determinación del número total de bacterias</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Coloque 10 g de la muestra en una bolsa estomacal y rellene con 90 g de NaCl peptona (esto ya es -1 dilución). <ol style="list-style-type: none"> Niveles de dilución seleccionados: -2 a -7 Agregue 1 ml de cada nivel de dilución a una placa de Petri vacía por duplicado. En los siguientes 45 minutos, se vierten 12-15 ml de agar (agar PC) (< 50 °C) en cada placa de Petri. ¡Siga el control de estéril! Mezcle la muestra y el agar con cuidado girando la placa de Petri y deje que el agar se solidifique. Las placas de Petri se incuban con la tapa bajada en la incubadora a 30 °C durante 72 horas. <p><i>Análisis cuantitativo de Listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Coloque 25 g de la muestra en una bolsa estomacal y rellene con 225 g de peptona de NaCl (esto ya es -1 dilución). Realice una dilución decimal hasta el nivel de dilución deseado; Medio de dilución: Agua de NaCl peptona <ol style="list-style-type: none"> Niveles de dilución: 0 (3x 0,33 ml), -1, -2 	Lote/Cepa	McFa-Wert	A		B		C			Vaca	T0	T3	T7	List.-cuant.	3 bolsas inoculadas	1 bolsa inoculada	1 bolsa inoculada	1 bolsa inoculada	List.-cual.	1 bolsa no inoculada			1 bolsa no inoculada	GKZ					Tecno	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada		Soja	T0	T3	T7	List.-cuant.	3 bolsas inoculadas	1 bolsa inoculada	1 bolsa inoculada	1 bolsa inoculada	List.-cual.	1 bolsa no inoculada			1 bolsa no inoculada	GKZ					Tecno	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada
Lote/Cepa	McFa-Wert																																																										
A																																																											
B																																																											
C																																																											
	Vaca	T0	T3	T7																																																							
List.-cuant.	3 bolsas inoculadas	1 bolsa inoculada	1 bolsa inoculada	1 bolsa inoculada																																																							
List.-cual.	1 bolsa no inoculada			1 bolsa no inoculada																																																							
GKZ																																																											
Tecno	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada																																																							
	Soja	T0	T3	T7																																																							
List.-cuant.	3 bolsas inoculadas	1 bolsa inoculada	1 bolsa inoculada	1 bolsa inoculada																																																							
List.-cual.	1 bolsa no inoculada			1 bolsa no inoculada																																																							
GKZ																																																											
Tecno	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada																																																							

	<ol style="list-style-type: none"> 3. Se añaden 0,1 ml de los niveles de dilución seleccionados a cada placa de <i>Listeria</i> Brilliance por duplicado. La muestra original (en el caso del queso, una muestra directamente de la bolsa estomacal) se divide en 3 platos de 0,333 ml cada uno para aumentar el límite de detección. 4. Las placas se colocan con la tapa hacia abajo en la incubadora a 37 °C durante 48 h (verifique después de 24 h y 48 h). <p><i>Evaluación cualitativa de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Se colocan 25 g de la muestra en una bolsa estomacal, se llenan con 225 ml de caldo medio Fraser a temperatura ambiente, se homogeneizan [230 rpm, 30 s] y se incuban a 30 °C durante 25 h. <p><i>Estudios tecnológicos (con las muestras no inoculadas)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinación del valor de pH • Determinación del valor aw
Día 6 Miércoles	<p><i>Análisis cuantitativo de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación cuantitativa de las placas de <i>Listeria</i> Brilliance. <p><i>Evaluación cualitativa de la listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 0,1 ml del medio caldo Fraser enriquecido e incubado se transfiere a 10 ml de caldo Fraser y se incuban a 37 °C durante 24 horas. 2. A continuación, el medio caldo Fraser se inocula en la superficie de una placa <i>Listeria</i> Brilliance con un ojal para crear colonias individuales bien definidas y se incuban a 37 °C durante 48 horas (comprobar después de 24-48 horas). Lo mismo se repite para las placas Palcam.
Día 7 Jueves	<p><i>Análisis cuantitativo de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación cuantitativa de las placas de <i>Listeria</i> Brilliance. <p><i>Evaluación cualitativa de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • El medio Fraser se inocula en la superficie de una placa <i>Listeria</i> Brilliance con un ojal para crear colonias individuales bien definidas y se incuban a 37 °C durante 48 horas (comprobar después de 24-48 horas). Lo mismo se repite para las placas Palcam.
Día 8 Viernes	<p><u>Sonda T₀</u></p> <p><i>Determinación del número total de bacterias</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación de las placas de PC para el número total de bacterias. <p><i>Evaluación cualitativa de la Listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación de las placas de medio Fraser <p><u>Sonda T₃</u></p> <p><i>Análisis cuantitativo de la listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 3. Coloque 25 g de la muestra en una bolsa estomacal y rellene con 225 g de peptona de NaCl (esto ya es -1 dilución). Se puede utilizar la misma bolsa estomacal y la misma serie de dilución para determinar el número total de bacterias. 4. Realice una dilución decimal hasta el nivel de dilución deseado; Medio de dilución: Agua de NaCl peptona <ol style="list-style-type: none"> a. Niveles de dilución: 0 (3x 0,33 ml), -1, -2, -3 5. Se añaden 0,1 ml de los niveles de dilución seleccionados a cada placa de <i>Listeria</i> Brilliance por duplicado. La muestra original (en el caso del queso, una muestra directamente de la bolsa del estómago) se divide en 3 platos de 333 µl cada uno para aumentar el límite de detección. 6. Las placas se colocan con la tapa hacia abajo en la incubadora a 37 °C durante 48 h (verifique después de 24 h y 48 h). (Uso de la incubadora refrigerada) <p><i>Estudios tecnológicos (con las muestras no inoculadas)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Determination of pH value • Determinación del valor aw
Día 11 Lunes	<p><u>Sonda T₀</u></p> <p><i>Evaluación cualitativa de listeria (muestra de T₀)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación de las placas Fraser <p><u>Sonda T₃</u></p> <p><i>Análisis cuantitativo de la listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 2. Evaluación cuantitativa de las placas de <i>Listeria</i> Brilliance.
Día 12 Martes	<p><u>Sonda T₇</u></p> <p><i>Determinación del número total de bacterias</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Coloque 10 g de la muestra en una bolsa estomacal y rellene con 90 g de NaCl peptona (esto ya es -1 dilución). <ol style="list-style-type: none"> a. Niveles de dilución seleccionados: -1 a -7 2. Agregue 1 ml de cada nivel de dilución a una placa de Petri vacía por duplicado. 3. En los siguientes 45 minutos, se vierten 12-15 ml de agar (agar PC) (< 50 °C) en cada placa de Petri. ¡Siga el control de estéril! 4. Mezcle la muestra y el agar con cuidado girando la placa de Petri y deje que el agar se solidifique. 5. Las placas de Petri se incuban con la tapa bajada en la incubadora a 30 °C durante 72 horas. <p><i>Análisis cuantitativo de Listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Coloque 25 g de la muestra en una bolsa estomacal y rellene con 225 g de peptona de NaCl (esto ya es -1 dilución). Se puede utilizar la misma bolsa estomacal y la misma serie de dilución para determinar el número total de bacterias. 2. Realice una dilución decimal hasta el nivel de dilución deseado; Medio de dilución: Agua de NaCl peptona <ol style="list-style-type: none"> a. Niveles de dilución: 0 (3x 0,33 ml), -1, -2, -3 3. Se añaden 0,1 ml de los niveles de dilución seleccionados a cada placa de <i>Listeria</i> Brilliance por duplicado. La muestra original (en el caso del queso, una muestra directamente de la bolsa del Stomacher) se divide en 3 platos de 333 µl cada uno para aumentar el límite de detección. 4. Las placas se colocan con la tapa hacia abajo en la incubadora a 37°C durante 48 h (verifique después de 24 h y 48 h).

	<p><i>Evaluación cualitativa de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Se colocan 25 g de la muestra en una bolsa estomacal, se llenan con 225 ml de medio Fraser a temperatura ambiente, se homogeneizan [230 rpm, 30 s] y se incuban a 30 °C durante 25h. <p><i>Technological studies (with the non-inoculated samples)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinación del valor de pH • Determinación del valor av
Día 13 Miércoles	<p><u>Sonda T₇</u> <i>Análisis cuantitativo de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación cuantitativa de las placas de Listeria Brilliance. <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 0,1 ml del medio caldo Fraser enriquecido e incubado se transfiere a 10 ml de caldo Fraser y se incuba a 37 °C durante 24 horas. 2. A continuación, el medio caldo Fraser se inocula en la superficie de una placa Listeria Brilliance con un ojal para crear colonias individuales bien definidas y se incuban a 37 °C durante 48 horas (comprobar después de 24-48 horas). Lo mismo se repite para las placas Palcam.
Día 14 Jueves	<p><u>Sonda T₇</u> <i>Análisis cuantitativo de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación cuantitativa de las placas de Listeria Brilliance. <p><i>Evaluación cualitativa de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • El medio Fraser se inocula en la superficie de una placa Listeria Brilliance con un ojal para crear colonias individuales bien definidas y se incuban a 37 °C durante 48 horas (comprobar después de 24-48 horas). Lo mismo se repite para las placas Palcam.
Día 15 Viernes	<p><u>Sonda T₇</u> <i>Determinación del número total de bacterias</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación de las placas de PC para el número total de bacterias. <p><i>Evaluación cualitativa de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación de las placas de medio Fraser
Día 18 Lunes	<p><u>Sonda T₇</u> <i>Evaluación cualitativa de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación de las placas Fraser

Anexo 7: Prueba de desafío del queso

Challenge Cheese Test																																																	
Day 1 Friday	<p><i>Cultivation of cryocultures for the inoculate</i></p> <ol style="list-style-type: none"> For the strain cocktail, fractionate 1 bead of a cryoculture (-80°C) of the selected strains onto Columbia blood agar with sheep blood. Incubate at 37°C for 24 hours. <ul style="list-style-type: none"> Stripped strains: <table border="1" style="margin-left: 40px;"> <thead> <tr> <th colspan="2" style="text-align: center;"><i>L. innocua</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>DSM 20649 (bovine brain)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">B</td> <td><i>Listeria innocua</i> IV 2.1 (Salat rice)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">C</td> <td><i>Listeria innocua</i> 146 (Zoonosen AG)</td> </tr> </tbody> </table> 	<i>L. innocua</i>		A	DSM 20649 (bovine brain)	B	<i>Listeria innocua</i> IV 2.1 (Salat rice)	C	<i>Listeria innocua</i> 146 (Zoonosen AG)																																								
<i>L. innocua</i>																																																	
A	DSM 20649 (bovine brain)																																																
B	<i>Listeria innocua</i> IV 2.1 (Salat rice)																																																
C	<i>Listeria innocua</i> 146 (Zoonosen AG)																																																
Day 4 Monday	<p><i>Pre-enrichment and growth phase of the inoculate</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Remove fresh colony material from each strain with an inoculation loop and transfer to 10 ml of BHI and incubate stationery at 37°C for 24 h. 																																																
Day 5 Tuesday	<p><i>Control of the final inoculate and inoculation of the samples</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Control the density of the incubated strains using a McFa device. Time: <table border="1" style="margin-left: 40px;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">Lot/Strain</th> <th style="text-align: center;">McFa-Wert</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">B</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">C</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> Check that the logs have the same density. If in doubt, the suspensions must be diluted 1:10 (1 ml suspension, 9 ml NaCl peptone). A rule of three can be used to evaluate how much volume we need from each trunk. Then pour the individual stems together, mix well and create the stem cocktail. The stock cocktail is subsequently diluted and plated to ensure that it truly contains Log 9. Dilution levels: 7, 8, 9. Incubation 37°C, 24 h. <p><i>Inoculation of the cheese</i></p> <ol style="list-style-type: none"> The two types of cheese are chopped as hygienically as possible (Retch disinfection) and cooled (Retch settings: 5000 rpm, 2 x 5 s). The cheese is sterilely distributed into a total of 4 batches (500g) of 100g Stomacher bags (20 Stomacher bags in total). <table border="1" style="margin-left: 40px; margin-bottom: 20px;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Cow</th> <th style="text-align: center;">T0</th> <th style="text-align: center;">T3</th> <th style="text-align: center;">T7</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>List.-quant.</td> <td>3 inoculated bags</td> <td>1 inoculated bag</td> <td>1 inoculated bag</td> </tr> <tr> <td>List.-qual.</td> <td>1 non-inoculated bag</td> <td></td> <td>1 non-inoculated bag</td> </tr> <tr> <td>GKZ</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Techno</td> <td>1 non-inoculated bag</td> <td>1 non-inoculated bag</td> <td>1 non-inoculated bag</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1" style="margin-left: 40px;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Vegan</th> <th style="text-align: center;">T0</th> <th style="text-align: center;">T3</th> <th style="text-align: center;">T7</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>List.-quant.</td> <td>3 inoculated bags</td> <td>1 inoculated bag</td> <td>1 inoculated bag</td> </tr> <tr> <td>List.-qual.</td> <td>1 non-inoculated bag</td> <td></td> <td>1 non-inoculated bag</td> </tr> <tr> <td>GKZ</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Techno</td> <td>1 non-inoculated bag</td> <td>1 non-inoculated bag</td> <td>1 non-inoculated bag</td> </tr> </tbody> </table> <ol style="list-style-type: none"> Fill each of the Stomacher bags with 100g cow's milk cheese or 100g soy cheese. The batches that should contain <i>Listeria</i> are subsequently inoculated. An initial concentration of 10² CFU/g should be achieved. For this purpose, the stock cocktail is diluted down to -4 in a decimal dilution series. Then add 100 µl of the -4 dilution to the Stomacher bags. The inoculated quantity is stoked at 230 rpm for 1 min in order to achieve an even distribution of the inoculate. The bags that do not contain <i>Listeria</i> are mixed with 100 µl NaCl peptone (the dilution medium) and also stoked at 230 rpm for 1 minute in order to achieve an even distribution of the inoculate. The bags are stored in the refrigerator at 6 °C for the upcoming examination points. <p><i>Determination of the total number of bacteria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Place 10 g of the sample in a stomach bag and fill with 90 g of NaCl peptone (this is already -1 dilution). <ol style="list-style-type: none"> Selected dilution levels: -2 to -7 Add 1ml of each dilution level to an empty Petri dish in duplicate. Within the next max. 45 minutes, 12-15ml Plate Count Agar (PC Agar) (< 50°C) is poured into each Petri dish. Follow the sterile check! Mix the sample and agar carefully by rotating the Petri dish and allow the agar to solidify. The Petri dishes are incubated with the lid down in the incubator at 30°C for 72 hours. <p><i>Quantitative Listeria analysis</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Place 25 g of the sample in a stomach bag and fill with 225 g of NaCl peptone (this is already -1 dilution). Make a decimal dilution to the desired dilution level; Dilution medium: NaCl peptone water <ol style="list-style-type: none"> Dilution levels: 0 (3x 0.33ml), -1, -2 	Lot/Strain	McFa-Wert	A		B		C		Cow	T0	T3	T7	List.-quant.	3 inoculated bags	1 inoculated bag	1 inoculated bag	List.-qual.	1 non-inoculated bag		1 non-inoculated bag	GKZ				Techno	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag	Vegan	T0	T3	T7	List.-quant.	3 inoculated bags	1 inoculated bag	1 inoculated bag	List.-qual.	1 non-inoculated bag		1 non-inoculated bag	GKZ				Techno	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag
Lot/Strain	McFa-Wert																																																
A																																																	
B																																																	
C																																																	
Cow	T0	T3	T7																																														
List.-quant.	3 inoculated bags	1 inoculated bag	1 inoculated bag																																														
List.-qual.	1 non-inoculated bag		1 non-inoculated bag																																														
GKZ																																																	
Techno	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag																																														
Vegan	T0	T3	T7																																														
List.-quant.	3 inoculated bags	1 inoculated bag	1 inoculated bag																																														
List.-qual.	1 non-inoculated bag		1 non-inoculated bag																																														
GKZ																																																	
Techno	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag	1 non-inoculated bag																																														

	<p>3. 0.1ml of the selected dilution levels are added to each Listeria Brilliance plate in duplicate. The original sample (in the case of cheese, a sample directly from the stomacher bag) is divided into 3 plates of 333 µl each to increase the detection limit.</p> <p>4. The plates are placed with the lid down in the incubator at 37°C for 48h (check after 24h & 48h).</p> <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <p>2. 25 g of the sample are placed in a stomach bag, filled with 225 ml of room temperature half-Fraser broth, homogenized [230rpm, 30s] and incubated at 30°C for 25h.</p> <p><i>Technological studies (with the non-inoculated samples)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Determination of pH value • Determination of the aw value
Day 6 Wednesday	<p><i>Quantitative analysis of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluation of the quantitative Listeria Brilliance plates. <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <p>1. 0.1ml of the enriched, incubated half Fraser broth is transferred to 10ml Fraser broth and incubated at 37°C for 24 hours.</p> <p>2. The half Fraser broth is then inoculated onto the surface of a Listeria Brilliance plate using an eyelet so that well-defined individual colonies are created and incubated at 37°C for 48 hours (check after 24-48 hours). The same is repeated for the Palcam plates.</p>
Day 7 Thursday	<p><i>Quantitative analysis of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluation of the quantitative Listeria Brilliance plates. <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • The Fraser broth is inoculated onto the surface of a Listeria Brilliance plate using an eyelet so that well-defined individual colonies are created and incubated at 37°C for 48 hours (check after 24-48 hours). The same is repeated for the Palcam plates.
Day 8 Friday	<p><u>Probe T₀</u></p> <p><i>Determination of the total number of bacteria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluation of the PC plates for the total number of bacteria. <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluation of the half-Fraser plates <p><u>Probe T₃</u></p> <p><i>Quantitative analysis of listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Place 25 g of the sample in a stomach bag and fill with 225 g of NaCl peptone (this is already -1 dilution). 2. Make a decimal dilution to the desired dilution level; Dilution medium: NaCl peptone water <ol style="list-style-type: none"> a. Dilution levels: 0 (3x 0.33ml), -1, -2, -3 3. 0.1ml of the selected dilution levels are added to each Listeria Brilliance plate in duplicate. The original sample (in the case of cheese, a sample directly from the stomacher bag) is divided into 3 plates of 333 µl each to increase the detection limit. 4. The plates are placed with the lid down in the incubator at 37°C for 48h (check after 24h & 48h). (Use of the cooled incubator) <p><i>Technological studies (with the non-inoculated samples)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Determination of pH value • Determination of the aw value
Day 11 Monday	<p><u>Probe T₀</u></p> <p><i>Qualitative evaluation of listeria (sample from T₀)</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 2. Evaluation of the Fraser plates <p><u>Probe T₃</u></p> <p><i>Quantitative analysis of listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 3. Evaluation of the quantitative Listeria Brilliance plates.
Day 12 Tuesday	<p><u>Probe T₇</u></p> <p><i>Determination of the total number of bacteria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Place 10 g of the sample in a stomach bag and fill with 90 g of NaCl peptone (this is already -1 dilution). <ol style="list-style-type: none"> a. Selected dilution levels: -1 to -7 2. Add 1ml of each dilution level to an empty Petri dish in duplicate. 3. Within the next max. 45 minutes, 12-15ml Plate Count Agar (PC Agar) (< 50°C) is poured into each Petri dish. Follow the sterile check! 4. Mix the sample and agar carefully by rotating the Petri dish and allow the agar to solidify. 5. The Petri dishes are incubated with the lid down in the incubator at 30°C for 72 hours. <p><i>Quantitative Listeria analysis</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Place 25 g of the sample in a stomach bag and fill with 225 g of NaCl peptone (this is already -1 dilution). 2. Make a decimal dilution to the desired dilution level; Dilution medium: NaCl peptone water <ol style="list-style-type: none"> a. Dilution levels: 0 (3x 0.33ml), -1, -2, -3 3. 0.1ml of the selected dilution levels are added to each Listeria Brilliance plate in duplicate. The original sample (in the case of cheese, a sample directly from the stomacher bag) is divided into 3 plates of 333 µl each to increase the detection limit. 4. The plates are placed with the lid down in the incubator at 37°C for 48h (check after 24h & 48h). <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 2. 25 g of the sample are placed in a stomach bag, filled with 225 ml of room temperature half-Fraser broth, homogenized [230rpm, 30s] and incubated at 30°C for 25h. <p><i>Technological studies (with the non-inoculated samples)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Determination of pH value • Determination of the aw value
Day 13	<p><u>Probe T₇</u></p>

Wednesday	<p><i>Quantitative analysis of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Evaluation of the quantitative Listeria Brilliance plates. <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 0.1ml of the enriched, incubated half Fraser broth is transferred to 10ml Fraser broth and incubated at 37°C for 24 hours. The half Fraser broth is then inoculated onto the surface of a Listeria Brilliance plate using an eyelet so that well-defined individual colonies are created and incubated at 37°C for 48 hours (check after 24-48 hours). The same is repeated for the Palcam plates.
Day 14 Thursday	<p><u>Probe T₇</u></p> <p><i>Quantitative analysis of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Evaluation of the quantitative Listeria Brilliance plates. <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> The Fraser broth is inoculated onto the surface of a Listeria Brilliance plate using an eyelet so that well-defined individual colonies are created and incubated at 37°C for 48 hours (check after 24-48 hours). The same is repeated for the Palcam plates.
Day 15 Friday	<p><u>Probe T₇</u></p> <p><i>Determination of the total number of bacteria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Evaluation of the PC plates for the total number of bacteria. <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Evaluation of the half-Fraser plates
Day 18 Monday	<p><u>Probe T₇</u></p> <p><i>Qualitative evaluation of listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Evaluation of the Fraser plates

Prueba de desafío del queso

Día 1 Viernes	<p><i>Cultivo de criocultivos para el inoculado</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Para el cóctel de cepas, fraccionar 1 gota de criocultivo (-80 °C) de las cepas seleccionadas en agar sangre Columbia con sangre de oveja. Incubar a 37°C durante 24 horas. <ul style="list-style-type: none"> Cepas libres: <table border="1" style="margin-left: 20px; width: 100%;"> <tr><td style="width: 5%;"></td><td style="text-align: center;"><i>L. innocua</i></td></tr> <tr><td>A</td><td>DSM 20649 (cerebro bovino)</td></tr> <tr><td>B</td><td><i>Listeria innocua</i> IV 2.1 (arroz salat)</td></tr> <tr><td>C</td><td><i>Listeria innocua</i> 146 (Zoonosis AG)</td></tr> </table> 		<i>L. innocua</i>	A	DSM 20649 (cerebro bovino)	B	<i>Listeria innocua</i> IV 2.1 (arroz salat)	C	<i>Listeria innocua</i> 146 (Zoonosis AG)																																								
	<i>L. innocua</i>																																																
A	DSM 20649 (cerebro bovino)																																																
B	<i>Listeria innocua</i> IV 2.1 (arroz salat)																																																
C	<i>Listeria innocua</i> 146 (Zoonosis AG)																																																
Día 4 Lunes	<p><i>Fase de pre-enriquecimiento y crecimiento del inoculado</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Retire el material fresco de la colonia de cada cepa con un circuito de inoculación y transfíralo a 10 ml de BHI e incube la papelería a 37 °C durante 24 h. 																																																
Día 5 Martes	<p><i>Control de la inoculación final e inoculación de las muestras</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Controle la densidad de las cepas incubadas mediante un dispositivo McFa. Hora: <table border="1" style="margin-left: 20px; width: 100%;"> <thead> <tr><th style="width: 50%;">Lote/Cepa</th><th style="width: 50%;">McFa-Wert</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td style="text-align: center;">A</td><td></td></tr> <tr><td style="text-align: center;">B</td><td></td></tr> <tr><td style="text-align: center;">C</td><td></td></tr> </tbody> </table> Compruebe que los registros tengan la misma densidad. En caso de duda, las suspensiones deben diluirse 1:10 (1 ml de suspensión, 9 ml de peptona de NaCl). Se puede usar una regla de tres para evaluar cuánto volumen necesitamos de cada tronco. A continuación, vierta los tallos individuales, mezcle bien y cree el cóctel de tallos. Posteriormente, el cóctel de caldo se diluye y se coloca en los platos para garantizar que realmente contenga Log 9. Niveles de dilución: 7, 8, 9. Incubación 37°C, 24 h. <p><i>Inoculación del queso</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Los dos tipos de queso se trocean de la forma más higiénica posible (desinfección Retch) y se enfrían (ajustes Retch: 5000 rpm, 2 x 5 s). El queso se distribuye estérilmente en un total de 4 lotes (500 g) de bolsas Stomacher de 100 g (20 bolsas Stomacher en total). <table border="1" style="margin-left: 20px; width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr><th style="width: 15%;">Vaca</th><th style="width: 25%;">T0</th><th style="width: 25%;">T3</th><th style="width: 35%;">T7</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>List.-cuant.</td><td>3 bolsas inoculadas</td><td>1 bolsa inoculada</td><td>1 bolsa inoculada</td></tr> <tr><td>List.-cual.</td><td>1 bolsa no inoculada</td><td></td><td>1 bolsa no inoculada</td></tr> <tr><td>GKZ</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Tecno</td><td>1 bolsa no inoculada</td><td>1 bolsa no inoculada</td><td>1 bolsa no inoculada</td></tr> </tbody> </table> <table border="1" style="margin-left: 20px; width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr><th style="width: 15%;">Vegano</th><th style="width: 25%;">T0</th><th style="width: 25%;">T3</th><th style="width: 35%;">T7</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>List.-cuant.</td><td>3 bolsas inoculadas</td><td>1 bolsa inoculada</td><td>1 bolsa inoculada</td></tr> <tr><td>List.-cual.</td><td>1 bolsa no inoculada</td><td></td><td>1 bolsa no inoculada</td></tr> <tr><td>GKZ</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Tecno</td><td>1 bolsa no inoculada</td><td>1 bolsa no inoculada</td><td>1 bolsa no inoculada</td></tr> </tbody> </table> <ol style="list-style-type: none"> llene cada una de las bolsas Stomacher con 100 g de queso de leche de vaca o 100 g de queso de soja. Posteriormente se inoculan los lotes que deben contener Listeria. Se debe alcanzar una concentración inicial de 102 UFC/g. Para ello, el cóctel de caldo se diluye hasta -4 en una serie de diluciones decimales. A continuación, añada 100 µl de la dilución -4 a las bolsas Stomacher. La cantidad inoculada se alimenta a 230 rpm durante 1 minuto para lograr una distribución uniforme del inoculado. Las bolsas que no contienen Listeria se mezclan con 100 µl de peptona de NaCl (el medio de dilución) y también se alimentan a 230 rpm durante 1 minuto para lograr una distribución uniforme de la inoculación. Las bolsas se almacenan en el refrigerador a 6 °C para los próximos puntos de examen. <p><i>Determinación del número total de bacterias</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Coloque 10 g de la muestra en una bolsa estomacal y rellene con 90 g de NaCl peptona (esto ya es -1 dilución). <ol style="list-style-type: none"> Niveles de dilución seleccionados: -2 a -7 Agregue 1 ml de cada nivel de dilución a una placa de Petri vacía por duplicado. En los siguientes 45 minutos, se vierten 12-15 ml de agar (agar PC) (< 50 °C) en cada placa de Petri. ¡Siga el control de estéril! Mezcle la muestra y el agar con cuidado girando la placa de Petri y deje que el agar se solidifique. Las placas de Petri se incuban con la tapa bajada en la incubadora a 30 °C durante 72 horas. <p><i>Análisis cuantitativo de Listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> Coloque 25 g de la muestra en una bolsa estomacal y rellene con 225 g de peptona de NaCl (esto ya es -1 dilución). Realice una dilución decimal hasta el nivel de dilución deseado; Medio de dilución: Agua de NaCl peptona <ol style="list-style-type: none"> Niveles de dilución: 0 (3x 0,33 ml), -1, -2 	Lote/Cepa	McFa-Wert	A		B		C		Vaca	T0	T3	T7	List.-cuant.	3 bolsas inoculadas	1 bolsa inoculada	1 bolsa inoculada	List.-cual.	1 bolsa no inoculada		1 bolsa no inoculada	GKZ				Tecno	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada	Vegano	T0	T3	T7	List.-cuant.	3 bolsas inoculadas	1 bolsa inoculada	1 bolsa inoculada	List.-cual.	1 bolsa no inoculada		1 bolsa no inoculada	GKZ				Tecno	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada
Lote/Cepa	McFa-Wert																																																
A																																																	
B																																																	
C																																																	
Vaca	T0	T3	T7																																														
List.-cuant.	3 bolsas inoculadas	1 bolsa inoculada	1 bolsa inoculada																																														
List.-cual.	1 bolsa no inoculada		1 bolsa no inoculada																																														
GKZ																																																	
Tecno	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada																																														
Vegano	T0	T3	T7																																														
List.-cuant.	3 bolsas inoculadas	1 bolsa inoculada	1 bolsa inoculada																																														
List.-cual.	1 bolsa no inoculada		1 bolsa no inoculada																																														
GKZ																																																	
Tecno	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada	1 bolsa no inoculada																																														

	<ol style="list-style-type: none"> 3. Se añaden 0,1 ml de los niveles de dilución seleccionados a cada placa de <i>Listeria Brilliance</i> por duplicado. La muestra original (en el caso del queso, una muestra directamente de la bolsa estomacal) se divide en 3 platos de 0,333 ml cada uno para aumentar el límite de detección. 4. Las placas se colocan con la tapa hacia abajo en la incubadora a 37 °C durante 48 h (verifique después de 24 h y 48 h). <p><i>Evaluación cualitativa de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Se colocan 25 g de la muestra en una bolsa estomacal, se llenan con 225 ml de caldo medio Fraser a temperatura ambiente, se homogeneizan [230 rpm, 30 s] y se incuban a 30 °C durante 25 h. <p><i>Estudios tecnológicos (con las muestras no inoculadas)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinación del valor de pH • Determinación del valor aw
Día 6 Miércoles	<p><i>Análisis cuantitativo de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación cuantitativa de las placas de <i>Listeria Brilliance</i>. <p><i>Evaluación cualitativa de la listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 0,1 ml del medio caldo Fraser enriquecido e incubado se transfiere a 10 ml de caldo Fraser y se incuban a 37 °C durante 24 horas. 2. A continuación, el medio caldo Fraser se inocula en la superficie de una placa <i>Listeria Brilliance</i> con un ojal para crear colonias individuales bien definidas y se incuban a 37 °C durante 48 horas (comprobar después de 24-48 horas). Lo mismo se repite para las placas Palcam.
Día 7 Jueves	<p><i>Análisis cuantitativo de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación cuantitativa de las placas de <i>Listeria Brilliance</i>. <p><i>Evaluación cualitativa de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • El medio Fraser se inocula en la superficie de una placa <i>Listeria Brilliance</i> con un ojal para crear colonias individuales bien definidas y se incuban a 37 °C durante 48 horas (comprobar después de 24-48 horas). Lo mismo se repite para las placas Palcam.
Día 8 Viernes	<p><u>Sonda T₀</u></p> <p><i>Determinación del número total de bacterias</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación de las placas de PC para el número total de bacterias. <p><i>Evaluación cualitativa de la Listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación de las placas de medio Fraser <p><u>Sonda T₃</u></p> <p><i>Análisis cuantitativo de la listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Coloque 25 g de la muestra en una bolsa estomacal y rellene con 225 g de peptona de NaCl (esto ya es -1 dilución). 2. Realice una dilución decimal hasta el nivel de dilución deseado; Medio de dilución: Agua de NaCl peptona <ol style="list-style-type: none"> a. Niveles de dilución: 0 (3x 0,33 ml), -1, -2, -3 3. Se añaden 0,1 ml de los niveles de dilución seleccionados a cada placa de <i>Listeria Brilliance</i> por duplicado. La muestra original (en el caso del queso, una muestra directamente de la bolsa del Stomacher) se divide en 3 platos de 333 µl cada uno para aumentar el límite de detección. 4. Las placas se colocan con la tapa hacia abajo en la incubadora a 37 °C durante 48 h (verifique después de 24 h y 48 h). (Uso de la incubadora refrigerada) <p><i>Estudios tecnológicos (con las muestras no inoculadas)</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Determinación del valor de pH <ul style="list-style-type: none"> • Determinación del valor aw
Día 11 Lunes	<p><u>Sonda T₀</u></p> <p><i>Evaluación cualitativa de listeria (muestra de T₀)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluación de las placas Fraser <p><u>Sonda T₃</u></p> <p><i>Análisis cuantitativo de la listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 4. Evaluación cuantitativa de las placas de <i>Listeria Brilliance</i>.
Día 12 Martes	<p><u>Sonda T₇</u></p> <p><i>Determinación del número total de bacterias</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Coloque 10 g de la muestra en una bolsa estomacal y rellene con 90 g de NaCl peptona (esto ya es -1 dilución). <ol style="list-style-type: none"> a. Niveles de dilución seleccionados: -1 a -7 2. Agregue 1 ml de cada nivel de dilución a una placa de Petri vacía por duplicado. 3. En los siguientes 45 minutos, se vierten 12-15 ml de agar (agar PC) (< 50 °C) en cada placa de Petri. ¡Siga el control de estéril! 4. Mezcle la muestra y el agar con cuidado girando la placa de Petri y deje que el agar se solidifique. 5. Las placas de Petri se incuban con la tapa bajada en la incubadora a 30 °C durante 72 horas. <p><i>Análisis cuantitativo de Listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Coloque 25 g de la muestra en una bolsa estomacal y rellene con 225 g de peptona de NaCl (esto ya es -1 dilución). 2. Realice una dilución decimal hasta el nivel de dilución deseado; Medio de dilución: Agua de NaCl peptona <ol style="list-style-type: none"> a. Niveles de dilución: 0 (3x 0,33 ml), -1, -2, -3 3. Se añaden 0,1 ml de los niveles de dilución seleccionados a cada placa de <i>Listeria Brilliance</i> por duplicado. La muestra original (en el caso del queso, una muestra directamente de la bolsa del Stomacher) se divide en 3 platos de 333 µl cada uno para aumentar el límite de detección. 4. Las placas se colocan con la tapa hacia abajo en la incubadora a 37 °C durante 48 h (verifique después de 24 h y 48 h). <p><i>Evaluación cualitativa de la listeria</i></p>

	<ul style="list-style-type: none"> Se colocan 25 g de la muestra en una bolsa estomacal, se llenan con 225 ml de caldo medio Fraser a temperatura ambiente, se homogeneizan [230 rpm, 30 s] y se incuban a 30 °C durante 25 h. <p><i>Technological studies (with the non-inoculated samples)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Determinación del valor de pH Determinación del valor aw
Día 13 Miércoles	<p><u>Sonda T₇</u> <i>Análisis cuantitativo de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Evaluación cuantitativa de las placas de Listeria Brilliance. <p><i>Evaluación cualitativa de la listeria</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 0,1 ml del medio caldo Fraser enriquecido e incubado se transfiere a 10 ml de caldo Fraser y se incuba a 37 °C durante 24 horas. A continuación, el medio caldo Fraser se inocula en la superficie de una placa Listeria Brilliance con un ojal para crear colonias individuales bien definidas y se incuban a 37 °C durante 48 horas (comprobar después de 24-48 horas). Lo mismo se repite para las placas Palcam.
Día 14 Jueves	<p><u>Sonda T₇</u> <i>Análisis cuantitativo de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Evaluación cuantitativa de las placas de Listeria Brilliance. <p><i>Evaluación cualitativa de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> El medio Fraser se inocula en la superficie de una placa Listeria Brilliance con un ojal para crear colonias individuales bien definidas y se incuban a 37 °C durante 48 horas (comprobar después de 24-48 horas). Lo mismo se repite para las placas Palcam.
Día 15 Viernes	<p><u>Sonda T₇</u> <i>Determinación del número total de bacterias</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Evaluación de las placas de PC para el número total de bacterias. <p><i>Evaluación cualitativa de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Evaluación de las placas de medio Fraser
Día 18 Lunes	<p><u>Sonda T₇</u> <i>Evaluación cualitativa de la listeria</i></p> <ul style="list-style-type: none"> Evaluación de las placas Fraser

Anexo 8. Bitácora de Trabajo Firmada



Universidad Nacional, Costa Rica
Escuela de Medicina Veterinaria

Bitácora de Pasantía de Trabajo Final de Graduación

Estudiante/Student: Lucía Alvarenga Castro

Nombre de supervisor/Supervisor: Johanna Vahle and Nadja Jeßberger

Lugar/Place: Milchhygiene, Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (Milk Hygiene, Institute for Food Quality and Safety, Hannover Veterinary University Foundation)

Fecha/Date	Actividades/Activities	# horas/ # hours	Firma del supervisor/ supervisor signature
1/2/2024	<ul style="list-style-type: none"> Introduction to laboratories, review of safety regulations, observation of a food microbiology experiment with two antibodies with fluorescence markers to measure how much the toxin binds to the intestinal cell with control, positive and negative. 	7	
2/2/2024	<ul style="list-style-type: none"> A customer sent a meat sample that was cultured on blood agar to make gram stains, catalase and oxidase reactions and microscopic observation of the bacteria in saline solution were performed to observe shape and mobility. All these tests in order to reach the recognition of the bacteria found. 	4	
5/2/2024	<ul style="list-style-type: none"> Participation in an experiment where they have 3 different species of Listeria and 3 types of surfaces with different porosity are tested to determine in which surface Listeria grows best on. The materials tested included glass, metal and PVC surfaces. Each material was placed with a culture medium suitable for Listeria and the 3 species of Listeria at a temperature of 12 °C for 72 	8	



Fecha/Date	Actividades/Activities	# horas/ # hours	Firma del supervisor/ supervisor signature
6/2/2024	<ul style="list-style-type: none"> Gram stain, observation of bacteria in saline, oxidase and catalase reactions for a client's sample, previously cultured on blood agar. Milk samples were received from the 4 quarters of two animals of the cattle clinic, cultures were carried out on blood agar, Agar with chloramphenicol glucose yeast extract and liquid medium. 	4	
7/2/2024	<ul style="list-style-type: none"> Continuation of sampling of sausages from a local butcher shop. Tests for the determination of bacteria that grew from the milk samples of the clinic animals (KOH, Oxidase, Catalase, Staphylase, Coagulase, Culture in chromoculture agar, Ultraviolet light test in aesculin blood agar) 	8	
8/2/2024	<ul style="list-style-type: none"> From a suitable culture medium where <i>Listeria monocytogenes</i> was growing, the biofilm was extracted and placed in wells to perform an analysis with plasma water, normal water and peracetic acid and then culture them on agar for 24 hours and observe which obtained the least CFU. Cultures were observed on chromoculture agar for determination of bacteria. 	8	
9/2/2024	<ul style="list-style-type: none"> Gram stain, observation of bacteria in saline, oxidase and catalase reactions for a client's sample, previously cultured on blood agar. Preparation of liquid media suitable 	4	

UNIVERSIDAD NACIONAL COSTA RICA		For the growth of <i>Listeria monocytogenes</i> .		
12/2/2024	8	<ul style="list-style-type: none"> Three strains of <i>Listeria</i> were placed in three types of surfaces with different porosity are tested to determine which surface the <i>Listeria</i> biofilm grows best on. They test glass, metal and PVC surfaces. Each material was placed with a culture medium suitable for <i>Listeria</i> and the three species of <i>Listeria</i> at a temperature of 12 °C for 72 hours. Two blood agar plates were observed from swabs from refrigerators at a local supermarket. There was bacteria growth. Agar cultures of previously selected bacteria were carried out. 	8	N.Z.
13/2/2024	8	<ul style="list-style-type: none"> Gram stain, observation of bacteria in saline, oxidase and catalase reactions for a client's sample, previously cultured on blood agar. Milk samples were received from animals from the clinic, cultures were carried out on blood agar, Agar with chloramphenicol glucose yeast extract and in liquid medium. 	8	N.Z.
14/2/2024	8	<ul style="list-style-type: none"> Dilutions Preparation of different agars. Tests for determination of bacteria that grew from the milk samples of the clinic animals (KOH, Oxidase, Katalase, Staphylase, Coagulase, Culture in chromoculture agar, Ultraviolet light test in blood agar aesculin, pyrase, Serogroup B, serogroup C, Hipp test) 	8	N.Z.
15/2/2024	8	<ul style="list-style-type: none"> Bacterial colony count of samples previously grown in agar. MALDI toff for determination of bacteria previously grown on agar, through the use of technology using a laser to determine the molecular weight of the bacterial colony and determine which bacteria it is. 	8	N.Z.
16/2/2024	8	<ul style="list-style-type: none"> Counting of <i>Listeria</i> colonies 	8	N.Z.


UNIVERSIDAD NACIONAL COSTA RICA		incubated in agar specialized for the growth of this bacteria.		
19/2/2024	6	<ul style="list-style-type: none"> Preparation of dilutions The vegan cheese project began: Only one of the 5 vegan cheeses was sampled. The samples were labeled with the numbers: 6-7-8-9-10 For sample number 6: <ul style="list-style-type: none"> For the total count of bacteria, 10 g of sample was placed with 90 ml of peptone NaCl and dilutions from -1 to -9 were prepared, then they were placed on Agar for total count of bacteria and duplicate, incubated for 72 hours at 30 °C. To test for <i>Enterobacteriaceae</i>, dilutions from -1 to -5 are made and placed on Crystal Violet, Neutral Red, Bile Glucose Agar (VRBG) at 37 °C for 24 hours. For the <i>E. coli</i> detection test, dilutions from -1 to -5 are made and placed on TBX agar, incubated at 44 °C for 18-24 hours. For the Salmonella test, 25 g of cheese are placed in 225 g of buffered peptone water at room temperature. Incubate the enrichment at 34-38°C for 18 ± 2 hours. For the <i>Listeria</i> test, 25 g of the sample are placed with 225 ml of Half-Fraser broth at room temperature and incubated at 30°C for 25 h. 	6	N.Z.
20/2/2024	8	<ul style="list-style-type: none"> Samples 7-8-9-10 are sampled: <ul style="list-style-type: none"> For the total count of bacteria, 10 g of sample was placed with 90 ml of peptone NaCl and dilutions from -1 to -9 were prepared, then they were placed on Agar for total count of bacteria and duplicate, incubated for 72 hours at 30 °C. To test for <i>Enterobacteriaceae</i>, dilutions from -1 to -5 are made and placed on Crystal Violet, Neutral Red, Bile Glucose Agar (VRBG) at 37°C for 24 hours. 	8	N.Z.


<p>UNIVERSIDAD NACIONAL COSTA RICA</p>	<p>For the <i>E. coli</i> detection test, dilutions from -1 to -5 are made and placed on TBX agar, incubated at 44 °C for 18-24 hours.</p> <ul style="list-style-type: none"> For the <i>Salmonella</i> test, 25 g of cheese are placed in 225 g of buffered peptone water at room temperature. Incubate the enrichment at 34-38°C for 18 ± 2 hours. For the <i>Listeria</i> test, 25 g of the sample is placed with 225 ml of Half-fraser broth at room temperature and incubated at 30°C for 25 h. <p>For cheese sample 6:</p> <ul style="list-style-type: none"> From the first sample of cheese with buffered water, a tube was inoculated with 0.1 ml of the broth with 10 mL of RVS broth (incubated at 41.5 °C for 24 hrs +3) and 1 ml was transferred into a tube. test with MTTn broth and incubate (34-38 °C for 24 ± 3 hrs). For the <i>Listeria</i> detection test, transfer .1 ml of the incubated and enriched Half-Fraser broth to 10 ml of Fraser broth and incubate at 37°C for 24 hours. The surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate is inoculated with broth. Half-fraser using an eyelet to form well-separated individual colonies and incubate at 37°C for 48 h. The same procedure is repeated for the Palcam plates. Cooking of a vegan cheese with soy yogurt and cashew nut seeds. 		
<p>21/2/2024</p>	<p>For sample 6:</p> <ul style="list-style-type: none"> For the <i>Listeria</i> detection test: The surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate is inoculated with Fraser broth using an eyelet to form well-separated individual colonies and incubated at 37°C for 48 h. The same procedure is repeated for the Palcam plates. Both with duplicate. For the <i>Salmonella</i> detection test: the surface of an XLD plate is inoculated with the culture obtained in the RVS 	<p>8</p>	<p>P N.7</p>


<p>UNIVERSIDAD NACIONAL COSTA RICA</p>	<p>broth using a 10 µl inoculation loop so that well-separated individual colonies are formed. A Brilliance Salmonella plate is inoculated in the same way. The surface of an XLD plate is inoculated with the culture obtained in the MKTTn broth using a 10 µl inoculation loop so that well-separated individual colonies are formed. A Brilliance Salmonella plate is inoculated in the same way. Both with duplicate. Both with duplicate. Incubate the plates for 24 ± 3 hours at 34-38 °C.</p> <p>For the 7-8-9-10 cheese sample:</p> <ul style="list-style-type: none"> From the cheese sample with buffered water, a tube was inoculated with 0.1 ml of the broth with 10 mL of RVS broth (incubated at 41.5 °C for 24 hrs +3) and 1 ml was transferred into a tube of assay with MTTn broth and incubate (34-38 °C for 24 ± 3 hrs). For the <i>Listeria</i> detection test, transfer .1 ml of the incubated and enriched Half-Fraser broth to 10 ml of Fraser broth and incubate at 37°C for 24 hours. The surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate is inoculated with broth. Half-fraser using an eyelet to form well-separated individual colonies and incubate at 37°C for 48 h. The same procedure is repeated for the Palcam plates. We continued with the own production of a vegan cheese with soy yogurt and cashew nut seeds and the pH was measured. 		
<p>22/2/2024</p>	<p>For sample 6:</p> <ul style="list-style-type: none"> Analysis of PC plates for total bacterial count. Half-fraser plates were evaluated for the <i>Listeria</i> detection test. <p>For sample 7-8-9-10:</p> <ul style="list-style-type: none"> Isolation of colonies that grew on COL S agar. For the <i>Listeria</i> detection test: The 	<p>8</p>	<p>P N.7</p>


	<p>surface of a Listeria Brilliance plate is inoculated with Fraser broth using an eyelet to form well-separated individual colonies and incubated at 37°C for 48 h. The same procedure is repeated for the Palcam plates. Both with duplicate.</p> <ul style="list-style-type: none"> For the Salmonella detection test: the surface of an XLD plate is inoculated with the culture obtained in the RVS broth using a 10 µl inoculation loop so that well-separated individual colonies are formed. A Brilliance Salmonella plate is inoculated in the same way. The surface of an XLD plate is inoculated with the culture obtained in the MKTTn broth using a 10 µl inoculation loop so that well-separated individual colonies are formed. A Brilliance Salmonella plate is inoculated in the same way. Both with duplicate. Incubate the plates for 24 ± 3 hours at 34-38 °C. 		
23/2/2024	<p>For sample 6:</p> <ul style="list-style-type: none"> Evaluation of <i>Listeria</i> detection test with Fraser broth on Listeria Brilliance and Palca plates. <p>For sample 7-8-9-10:</p> <ul style="list-style-type: none"> Analysis of PC plates for total bacterial count. Half-fraser plates were evaluated for the Listeria detection test. For all samples, the plates for the Salmonella detection test (XLS and Salmonella Brilliance) were analyzed. 	8	N.7
26/2/2024	<p>The vegan cheese sampling continues: (samples 11-12-13-14-15)</p> <ul style="list-style-type: none"> For the total count of bacteria, 10 g of sample was placed with 90 ml of peptone NaCl and dilutions from -1 to -9 were prepared, then they were placed on Agar for total count of bacteria and duplicate, incubated for 72 hours at 30 °C. For the detection of Bacillus, the -1 dilution from Peptone NaCl was 	8	N.7

	<p>incubated in Col S blood agar and incubated at 370C for 24 hrs.</p> <ul style="list-style-type: none"> To test for Enterobacteriaceae, dilutions from -1 to -5 were made and placed on Crystal Violet, Neutral Red, Bile Glucose Agar (VRBG) at 37 °C for 24 hours. For the E. coli detection test, dilutions from -1 to -5 were made and placed on TBX agar, incubated at 44 °C for 18-24 hours. For the Salmonella test, 25 g of cheese were placed in 225 g of buffered peptone water at room temperature. Incubate the enrichment at 34-38°C for 18 ± 2 hours. For the Listeria test, 25 g of the sample were placed with 225 ml of Half-fraser broth at room temperature and incubated at 30°C for 25 h. 		
27/2/2024	<p>For sample 11-12-13-14-15:</p> <ul style="list-style-type: none"> For the detection of Bacillus: Analysis of the 3 COL S. Isolation of the different colonies on new Col S plates, and then incubated at 370C for 24 hrs. For the Enterobacteriaceae: Collection of colonies for confirmation then incubated on a non-selective nutrient agar for 24 h at 37 °C. For the E. coli detection test: Evaluation of the plates. For the Salmonella test the samples placed in buffered peptone water were inoculated in tubes with 0.1 ml of the broth with 10 mL of RVS broth (incubated at 41.5 0C for 24 hrs +3) and 1 ml was transferred into a test tube with broth of MKTTn and incubated (34-38 °C for 24 ± 3 hrs). For the Listeria detection test, 0.1 ml of the incubated and enriched Half-Fraser broth sample was transferred to 10 ml of Fraser broth and 	8	N.7

	<p>incubated at 37°C for 24 hours. The surface of a Listeria Brilliance plate was inoculated with Half-frasser broth and incubated at 37°C for 48 h. The same procedure is repeated for the Palcam plates.</p> <ul style="list-style-type: none"> Vegan cheese made from soy milk and nuts was created in the dairy processing kitchen of the food microbiology department, under strict standards of good manufacturing practices and special care to HACCP so as not to affect the quality and safety of the product. The purpose of this procedure is to determine the appropriate time to inoculate the product with Listeria and perform analysis of the survival and propagation of this bacteria in a vegan matrix compared to a dairy matrix. 		
<p>28/2/2024</p>	<p>For sample 11-12-13-14-15:</p> <ul style="list-style-type: none"> For the detection of Bacillus: native, gram stains, catalase and oxidase tests as a way of identification of the isolated bacterias were carried out. For the Enterobacteriaceae: Performing the oxidase test on suspicious colonies. Suspicious colonies were transferred to a tube containing an OF glucose medium and incubated for 24 h at 37 °C. For the Salmonella detection test: the surface of an XLD plate and a Brilliance Salmonella plate were inoculated with the culture obtained in the RVS broth. Also the surface of an XLD plate and a Brilliance Salmonella plate were inoculated with the culture obtained in the MKTTn broth. Both with duplicate. The plates were incubated for 24 ± 3 hours at 34-38 °C. For the Listeria detection test: The surface of a Listeria Brilliance plate was inoculated with Fraser broth and 	<p>8</p>	<p><i>P. N.Z.</i></p>

	<p>incubated at 37°C for 48 h. The same procedure was repeated for the Palcam plates. Both with duplicate.</p> <ul style="list-style-type: none"> Vegan cheese made from soy milk and nuts was created in the dairy processing kitchen of the food microbiology department, under strict standards of good manufacturing practices and special care to HACCP so as not to affect the quality and safety of the product. The purpose of this procedure is to determine the appropriate time to inoculate the product with Listeria and perform analysis of the survival and propagation of this bacteria in a vegan matrix compared to a dairy matrix. 		
<p>29/2/2024</p>	<p>For sample 11-12-13-14-15:</p> <ul style="list-style-type: none"> For the total count of bacteria: Analysis of PC plates. For the <i>Enterobacteriaceae</i>: Evaluation of the glucose tube. For the <i>Salmonella</i> detection test: Evaluation of the plates and other confirmatory tests of suspicious colonies were performed, such as serological examination and performance of an API. For the <i>Listeria</i> detection test: Half-fraser plates were evaluated for the Listeria detection test. 	<p>6</p>	<p><i>P. N.Z.</i></p>
<p>1/3/2024</p>	<p>For sample 11-12-13-14-15:</p> <ul style="list-style-type: none"> For the Listeria detection test: Evaluation of the Listeria Brilliance and Palcam plates from the Frasser broth. Additional tests were made to confirm for suspicious colonies: Microscopic appearance, Beta-hemolysis, Catalase, Mobility test, CAMP test. Data analysis. 	<p>6</p>	<p><i>P. N.Z.</i></p>
<p>4/3/2024</p>	<p>The sampling project continues with vegan yogurts: (samples 17-18-20-21-22)</p> <ul style="list-style-type: none"> For the total count of bacteria, 10 g of sample was placed with 90 ml of 	<p>8</p>	<p><i>P. N.Z.</i></p>

	<p>Peptone NaCl and dilutions from -1 to -9 were prepared, then they were placed on Agar for total count of bacteria and duplicate, incubated for 72 hours at 30 °C.</p> <ul style="list-style-type: none"> For the detection of Bacillus, the -1 dilution from Peptone NaCl was cultured in Col S blood agar and incubated at 37°C for 24 hrs. To test for Enterobacteriaceae, dilutions from -1 to -5 were made and placed on Crystal Violet, Neutral Red, Bile Glucose Agar (VRBG) at 37 °C for 24 hours. For the E. coli detection test, dilutions from -1 to -5 were made and placed on TBX agar, incubated at 44 °C for 18-24 hours. For the Salmonella test, 25 g of cheese were placed in 225 g of buffered peptone water at room temperature. Incubate the enrichment at 34-38°C for 18 ± 2 hours. For the Listeria test, 25 g of the sample were placed with 225 ml of Half-fraser broth at room temperature and incubated at 30°C for 25 h. 		
5/3/2024	<p>The sampling project continues with vegan yogurts: (samples 17-18-20-21-22)</p> <ul style="list-style-type: none"> For the detection of Bacillus: Analysis of the 3 COL S. Isolation of the different colonies on new Col S plates, and then incubated at 37°C for 24 hrs. For the Enterobacteriaceae: Collection of colonies for confirmation then incubated on a non-selective nutrient agar for 24 h at 37 °C. For the E. coli detection test: Evaluation of the plates. For the Salmonella test the samples placed in buffered peptone water were inoculated in tubes with 0.1 ml of the broth with 10 mL of RVS broth (incubated at 41.5 °C for 24 hrs +3) 	8	

	<p>and 1 ml was transferred into a test tube with broth of MKTTn and incubated (34-38 °C for 24 ± 3 hrs).</p> <ul style="list-style-type: none"> For the Listeria detection test, 0.1 ml of the incubated and enriched Half-Fraser broth sample was transferred to 10 ml of Fraser broth and incubated at 37°C for 24 hours. The surface of a Listeria Brilliance plate was inoculated with Half-fraser broth and incubated at 37°C for 48 h. The same procedure is repeated for the Palcam plates 		
6/3/2024	<p>The sampling project continues with vegan yogurts: (samples 17-18-20-21-22)</p> <ul style="list-style-type: none"> For the detection of Bacillus: native, gram stains, catalase and oxidase tests as a way of identification of the isolated bacterias were carried out. For the Enterobacteriaceae: Performing the oxidase test on suspicious colonies. Suspicious colonies were transferred to a tube containing an OF glucose medium and incubated for 24 h at 37 °C. For the Salmonella detection test: the surface of an XLD plate and a Brilliance Salmonella plate were inoculated with the culture obtained in the RVS broth. Also the surface of an XLD plate and a Brilliance Salmonella plate were inoculated with the culture obtained in the MKTTn broth. Both with duplicate. The plates were incubated for 24 ± 3 hours at 34-38 °C. For the Listeria detection test: The surface of a Listeria Brilliance plate was inoculated with Fraser broth and incubated at 37°C for 48 h. The same procedure was repeated for the Palcam plates. Both with duplicate. Vegan cheese made from soy milk and nuts was created in the dairy processing kitchen of the food 	8	

	<p>microbiology department, under strict standards of good manufacturing practices and special care to HACCP so as not to affect the quality and safety of the product. The purpose of this procedure is to determine the appropriate time to inoculate the product with <i>Listeria</i> and perform analysis of the survival and propagation of this bacteria in a vegan matrix compared to a dairy matrix.</p>		
	<p>For samples 17-18-20-21-22:</p> <ul style="list-style-type: none"> For the total count of bacteria: Analysis of PC plates. For the <i>Enterobacteriaceae</i>: Evaluation of the glucose tube. For the <i>Salmonella</i> detection test: Evaluation of the plates and other confirmatory tests of suspicious colonies were performed, such as serological examination and performance of an APL. For the <i>Listeria</i> detection test: Half-fraser plates were evaluated for the <i>Listeria</i> detection test. Vegan cheese made from soy milk and nuts was created in the dairy processing kitchen of the food microbiology department, under strict standards of good manufacturing practices and special care to HACCP so as not to affect the quality and safety of the product. The purpose of this procedure is to determine the appropriate time to inoculate the product with <i>Listeria</i> and perform analysis of the survival and propagation of this bacteria in a vegan matrix compared to a dairy matrix. 	8	N.F.
7/3/2024	<p>For samples 17-18-20-21-22:</p> <ul style="list-style-type: none"> For the <i>Listeria</i> detection test: Evaluation of the <i>Listeria</i> Brilliance and Palcam plates from the Frasser broth. Additional tests were made to 	6	N.F.

	<p>confirm for suspicious colonies: Microscopic appearance, Beta-hemolysis, Catalase, Mobility test, CAMP test</p> <ul style="list-style-type: none"> Data analysis. 		
11/3/2024	<p>The sampling project continues with vegan yogurts: (samples 23-24-25-26-27)</p> <ul style="list-style-type: none"> For the total count of bacteria, 10 g of sample was placed with 90 ml of peptone NaCl and dilutions from -1 to -9 were prepared, then they were placed on Agar for total count of bacteria and duplicate, incubated for 72 hours at 30 °C. For the detection of <i>Bacillus</i>, the -1 dilution from Peptone NaCl was cultured in Col S blood agar and incubated at 37°C for 24 hrs. To test for <i>Enterobacteriaceae</i>, dilutions from -1 to -5 were made and placed on Crystal Violet, Neutral Red, Bile Glucose Agar (VRBG) at 37 °C for 24 hours. For the <i>E. coli</i> detection test, dilutions from -1 to -5 were made and placed on TBX agar, incubated at 44 °C for 18-24 hours. For the <i>Salmonella</i> test, 25 g of cheese were placed in 225 g of buffered peptone water at room temperature. Incubate the enrichment at 34-38°C for 18 ± 2 hours. For the <i>Listeria</i> test, 25 g of the sample were placed with 225 ml of Half-fraser broth at room temperature and incubated at 30°C for 25 h. 	8	N.F.
12/3/2024	<p>The sampling project continues with vegan yogurts: (samples 23-24-25-26-27)</p> <ul style="list-style-type: none"> For the detection of <i>Bacillus</i>: Analysis of the 3 COL S. Isolation of the different colonies on new Col S plates, and then incubated at 37°C for 24 hrs. For the <i>Enterobacteriaceae</i>: Collection of colonies for confirmation then incubated on a non- 	8	N.F.

	<p>selective nutrient agar for 24 h at 37 °C.</p> <ul style="list-style-type: none"> For the E. coli detection test: Evaluation of the plates. For the Salmonella test the samples placed in buffered peptone water were inoculated in tubes with 0.1 ml of the broth with 10 mL of RVS broth (incubated at 41.5 °C for 24 hrs +3) and 1 ml was transferred into a test tube with broth of MKTTn and incubated (34-38 °C for 24 ± 3 hrs). For the Listeria detection test, 0.1 ml of the incubated and enriched Half-Fraser broth sample was transferred to 10 ml of Fraser broth and incubated at 37°C for 24 hours. The surface of a Listeria Brilliance plate was inoculated with Half-fraser broth and incubated at 37°C for 48 h. The same procedure is repeated for the Palcam plates. 		
13/3/2024	<p>The sampling project continues with vegan yogurts: (samples 23-24-25-26-27)</p> <ul style="list-style-type: none"> For the detection of <i>Bacillus</i>: native, gram stains, catalase and oxidase tests as a way of identification of the isolated bacterias were carried out. For the <i>Enterobacteriaceae</i>: Performing the oxidase test on suspicious colonies. Suspicious colonies were transferred to a tube containing an OF glucose medium and incubated for 24 h at 37 °C. For the <i>Salmonella</i> detection test: the surface of an XLD plate and a Brilliance <i>Salmonella</i> plate were inoculated with the culture obtained in the RVS broth. Also the surface of an XLD plate and a Brilliance <i>Salmonella</i> plate were inoculated with the culture obtained in the MKTTn broth. Both with duplicate. The plates were incubated for 24 ± 3 hours at 34-38 °C. For the <i>Listeria</i> detection test: The 	8	N.Z.

	<p>surface of a Listeria Brilliance plate was inoculated with Fraser broth and incubated at 37°C for 48 h. The same procedure was repeated for the Palcam plates. Both with duplicate.</p>		
14/3/2024	<p>The sampling project continues with vegan yogurts: (samples 23-24-25-26-27)</p> <ul style="list-style-type: none"> For the total count of bacteria: Analysis of PC plates. For the <i>Enterobacteriaceae</i>: Evaluation of the glucose tube. For the <i>Salmonella</i> detection test: Evaluation of the plates and other confirmatory tests of suspicious colonies were performed, such as serological examination and performance of an API. For the <i>Listeria</i> detection test: Half-fraser plates were evaluated for the Listeria detection test. 	6	N.Z.
15/3/2024	<p>The sampling project continues with vegan yogurts: (samples 23-24-25-26-27)</p> <ul style="list-style-type: none"> For the Listeria detection test: Evaluation of the Listeria Brilliance and Palcam plates from the Fraser broth. Additional tests were made to confirm for suspicious colonies: Microscopic appearance, Beta-hemolysis, Catalase, Mobility test, CAMP test. Data analysis. 	4	N.Z.
18/3/2024	<p>The sampling project continues with dairy yogurts: (samples 28-29-30-31-32)</p> <ul style="list-style-type: none"> For the total count of bacteria, 10 g of sample was placed with 90 ml of peptone NaCl and dilutions from -1 to -9 were prepared, then they were placed on Agar for total count of bacteria and duplicate, incubated for 72 hours at 30 °C. For the detection of <i>Bacillus</i>, the -1 dilution from Peptone NaCl was cultured in Col S blood agar and incubated at 37°C for 24 hrs. To test for <i>Enterobacteriaceae</i>, 	8	N.Z.

	<p>dilutions from -1 to -5 were made and placed on Crystal Violet, Neutral Red, Bile Glucose Agar (VRBG) at 37 °C for 24 hours.</p> <ul style="list-style-type: none"> For the <i>E. coli</i> detection test, dilutions from -1 to -5 were made and placed on TBX agar, incubated at 44 °C for 18-24 hours. For the <i>Salmonella</i> test, 25 g of cheese were placed in 225 g of buffered peptone water at room temperature. Incubate the enrichment at 34-38°C for 18 ± 2 hours. For the <i>Listeria</i> test, 25 g of the sample were placed with 225 ml of Half-fraser broth at room temperature and incubated at 30°C for 25 h. 		
19/3/2024	<p>The sampling project continues with dairy yogurts: (samples 28-29-30-31-32).</p> <ul style="list-style-type: none"> For the detection of <i>Bacillus</i>: Analysis of the 3 COL S. Isolation of the different colonies on new Col S plates, and then incubated at 37°C for 24 hrs. For the <i>Enterobacteriaceae</i>: Collection of colonies for confirmation then incubated on a non-selective nutrient agar for 24 h at 37 °C. For the <i>E. coli</i> detection test: Evaluation of the plates. For the <i>Salmonella</i> test the samples placed in buffered peptone water were inoculated in tubes with 0.1 ml of the broth with 10 ml of RVS broth (incubated at 41.5 °C for 24 hrs +3) and 1 ml was transferred into a test tube with broth of MKTTn and incubated (34-38 °C for 24 ± 3 hrs). For the <i>Listeria</i> detection test, 0.1 ml of the incubated and enriched Half-Fraser broth sample was transferred to 10 ml of Fraser broth and incubated at 37°C for 24 hours. The surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate was inoculated with Half-fraser 	8	

	<p>broth and incubated at 37°C for 48 h. The same procedure is repeated for the Palcam plates.</p>		
20/3/2024	<p>The sampling project continues with vegan yogurts: (samples 28-29-30-31-32)</p> <ul style="list-style-type: none"> For the detection of <i>Bacillus</i>: native, gram stains, catalase and oxidase tests as a way of identification of the isolated bacterias were carried out. For the <i>Enterobacteriaceae</i>: Performing the oxidase test on suspicious colonies. Suspicious colonies were transferred to a tube containing an OF glucose medium and incubated for 24 h at 37 °C. For the <i>Salmonella</i> detection test: the surface of an XLD plate and a Brilliance <i>Salmonella</i> plate were inoculated with the culture obtained in the RVS broth. Also the surface of an XLD plate and a Brilliance <i>Salmonella</i> plate were inoculated with the culture obtained in the MKTTn broth. Both with duplicate. The plates were incubated for 24 ± 3 hours at 34-38 °C. For the <i>Listeria</i> detection test: The surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate was inoculated with Fraser broth and incubated at 37°C for 48 h. The same procedure was repeated for the Palcam plates. Both with duplicate. 	8	
21/3/2024	<p>The sampling project continues with dairy yogurts: (samples 28-29-30-31-32).</p> <ul style="list-style-type: none"> For the total count of bacteria: Analysis of PC plates. For the <i>Enterobacteriaceae</i>: Evaluation of the glucose tube. For the <i>Salmonella</i> detection test: Evaluation of the plates and other confirmatory tests of suspicious colonies were performed, such as serological examination and performance of an API. For the <i>Listeria</i> detection test: Half- 	6	

UNIVERSIDAD NACIONAL COSTA RICA	LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA	FECHA	DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD	DIAS	OTROS
			Fraser plates were evaluated for the Listeria detection test.		
22/3/2024			The sampling project continues with dairy yogurts: (samples 28-29-30-31-32). • For the <i>Listeria</i> detection test: Evaluation of the Listeria Brilliance and Palcam plates from the Frasser broth. Additional tests were made to confirm for suspicious colonies: Microscopic appearance, Beta-hemolysis, Catalase, Mobility test, CAMP test • Data analysis.	6	N.Y.
25/3/2024			Gram stain, observation of bacteria, oxidase and catalase reactions in saline for a client's sample, previously cultured on blood agar. The milk samples received were tested both for the presence of bacteria that may indicate mastitis and for traces of antibiotics present that make the milk unsuitable for human consumption.	8	N.Y.
26/3/2024			Gram stain, observation of bacteria, oxidase, and catalase reactions in saline for a client's sample, previously cultured on blood agar. The milk samples received were tested both for the presence of bacteria that may indicate mastitis and for traces of antibiotics present that make the milk unsuitable for human consumption.	8	N.Y.
27/3/2024			Gram stain, observation of bacteria, oxidase and catalase reactions in saline for a client's sample, previously cultured on blood agar. The milk samples received were tested both for the presence of bacteria that may indicate mastitis and for traces of antibiotics present that make the milk unsuitable for human consumption.	8	N.Y.
28/3/2024			Gram stain, observation of bacteria, oxidase and catalase reactions in saline for a client's sample, previously cultured on blood agar. The milk samples received were tested both for the presence of bacteria that may indicate mastitis and for traces of antibiotics present that make the milk unsuitable for human consumption.	8	N.Y.
2/4/2024			Field sampling is carried out for client's	8	N.Y.

UNIVERSIDAD NACIONAL COSTA RICA	LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA	FECHA	DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD	DIAS	OTROS
			day. The swabs were taken to the laboratory for further examination.		
3/4/2024			Field sampling is carried out for client's dairy. The swabs were taken to the laboratory for further examination.	8	N.Y.
4/4/2024			Diary cheese and Vegan cheese made from soy milk and nuts was created and in the dairy processing kitchen of the food microbiology department, under strict standards of good manufacturing practices and special care to HACCP so as not to affect the quality and safety of the product. The purpose of this procedure is to determine the appropriate time to inoculate the product with <i>Listeria</i> and perform analysis of the survival and propagation of this bacteria in a vegan matrix compared to a dairy matrix.	8	N.Y.
5/4/2024			Diary Cheese and Vegan cheese made from soy milk and nuts was created in the dairy processing kitchen of the food microbiology department, under strict standards of good manufacturing practices and special care to HACCP so as not to affect the quality and safety of the product. The purpose of this procedure is to determine the appropriate time to inoculate the product with <i>Listeria</i> and perform analysis of the survival and propagation of this bacteria in a vegan matrix compared to a dairy matrix.	6	N.Y.
8/4/2024			• We began with the challenge test of vegan and dairy yogurt for subsequent inoculation with <i>Listeria</i> and subsequent sampling on days 0, day 3 and day 7 to observe the survival and propagation of this bacteria in the two matrices. The pre-enrichment and growth phase of the <i>L. innocua</i> inoculate occurred. Fresh colony material from each strain is removed with an inoculation loop and transferred to 10 ml of BHI and incubated stationary at 37 °C for 24 h. • Gram stain, observation of bacteria in saline, oxidase and catalase reactions	6	N.Y.

	<p>client's sample, previously cultured on blood agar.</p>		
9/4/2024	<ul style="list-style-type: none"> Start with Test 0 Control of the final inoculation and inoculation of the samples using a McFa device. The individual strains were poured into a large test tube, to create the strain cocktail. Subsequently, the mother cocktail is diluted and inoculated on plates to ensure that it actually contains Log 9. Dilution levels: 7, 8, 9. Incubation 37°C, 24 h. Inoculation with <i>L. innocua</i> of the yogurt mixtures is carried out. The yogurt is divided into a total of 4 batches (500 g) of 100 g Stomacher bags (20 Stomacher bags in total). The batches that should contain <i>Listeria</i> were inoculated. An initial concentration of 10⁹ CFU/g must be reached. The inoculated amount is shaken at 230 rpm for 1 min to achieve uniform distribution of the inoculate. The bags were stored in the refrigerator at 6 °C for the following examination points. Determination of the total number of bacteria: The sample was mixed with 90 g of NaCl peptone (this is already a -1 dilution). Selected dilution levels: -2 to -7 were added to an empty Petri dish in duplicate. After 45 minutes, 12-15 ml of plate count agar (PC agar) (<50°C) was poured into each Petri dish. The Petri dishes were incubated with the lid closed in the incubator at 30°C for 72 hours. Quantitative analysis of <i>Listeria</i>: The sample was placed in a bag with 225 g of NaCl peptone (this is already a -1 dilution). Dilution levels are performed: 0 (3x 0.33 ml), -1, -2. Then 0.1 ml of the selected dilution levels were added to each <i>Listeria</i> 	8	9 N.V.

	<p>Brilliance plate in duplicate. The original sample is divided into 3 plates of 0.333 ml each to increase the detection limit. The plates were placed with the lid down in the incubator at 37°C for 48 h.</p> <ul style="list-style-type: none"> Qualitative evaluation of listeria: the sample was placed with 225 ml of medium Fraser broth at room temperature, homogenized [230 rpm, 30 s] and incubated at 30 °C for 25 h . Technological studies (with non-inoculated samples): Determination of the pH value and Determination of the aw value. 		
10/4/2024	<p>Test T0:</p> <ul style="list-style-type: none"> Quantitative analysis of <i>Listeria</i>: Evaluation of quantitative <i>Listeria</i> Brilliance plates. Qualitative evaluation of listeria: 0.1 ml of incubated and enriched Fraser broth medium was transferred to 10 ml of Fraser broth and incubated at 37°C for 24 hours. Half of the Fraser broth was then inoculated onto the surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate using an eyelet to create well-defined individual colonies and incubated at 37°C for 48 hours. The same was repeated for Palcam plates. 	8	9 N.V.
11/4/2024	<p>Test T0:</p> <ul style="list-style-type: none"> Quantitative analysis of listeria: Evaluation of quantitative <i>Listeria</i> Brilliance plates. Qualitative assessment of listeria: Fraser broth was inoculated onto the surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate using an eyelet to create well-defined individual colonies and incubated at 37°C for 48 hours. The same was repeated for Palcam plates. 	6	9 N.V.
12/4/2024	<p>Test T0:</p> <ul style="list-style-type: none"> Determination of the total number of bacteria: Evaluation of PC plates for the total number of bacteria. Qualitative evaluation of listeria: 	8	9 N.V.


	<p>evaluation of Half-Fraser plates. Test T3:</p> <ul style="list-style-type: none"> Quantitative analysis of listeria: The sample was placed in a bag with 225 g of NaCl peptone (this is already a -1 dilution). Dilution levels are performed: 0 (3x 0.33 ml), -1, -2. Then 0.1 ml of the selected dilution levels were added to each Listeria Brilliance plate in duplicate. The original sample is divided into 3 plates of 0.333 ml each to increase the detection limit. The plates were placed with the lid down in the incubator at 37°C for 48 h. Technological studies (with non-inoculated samples): Determination of the pH value and Determination of the aw value The second corrected protocol of the <i>Listeria</i> inoculation test challenge in vegan and dairy yogurts began to compare which matrix best allows the growth of <i>Listeria</i>. Cryoculture cultivation was carried out for inoculation. For the strain cocktail, 1 cryoculture bead (-80 °C) of the selected strains was fractionated on Columbia blood agar with sheep blood and incubated at 37 °C for 24 hours. The Strains used: <i>L. innocua</i>: C DSM 20649 (Rinderhim), <i>Listeria innocua</i> IV 2.1 (Salat RIZ), <i>Listeria innocua</i> 146 (Zoonosen AG). 		
15/4/2024	<ul style="list-style-type: none"> The second protocol for the Test Challenge for inoculation of vegan and dairy yogurts continues. The following tests are performed (pH, Aw, qualitative <i>Listeria</i> examination, quantitative <i>Listeria</i> examination, and total bacteria count). It is repeated due to errors in the protocol. Pre-enrichment and growth phase of the <i>L. innocua</i> inoculate. The diary cheese samples continued: samples 34-35-36-37-38-39. 	8	

	<p>the total count of bacteria, 10 g of sample was placed with 90 ml of peptone NaCl and dilutions from -1 to -9 were prepared, then they were placed on Agar for total count of bacteria and duplicate, incubated for 72 hours at 30 °C.</p> <ul style="list-style-type: none"> For the detection of <i>Bacillus</i>, the -1 dilution from Peptone NaCl was cultured in Col S blood agar and incubated at 37°C for 24 hrs. To test for <i>Enterobacteriaceae</i>, dilutions from -1 to -5 were made and placed on Crystal Violet, Neutral Red, Bile Glucose Agar (VRBG) at 37 °C for 24 hours. For the <i>E. coli</i> detection test, dilutions from -1 to -5 were made and placed on TBX agar, incubated at 44 °C for 18-24 hours. For the <i>Salmonella</i> test, 25 g of cheese were placed in 225 g of buffered peptone water at room temperature. Incubate the enrichment at 34-38°C for 18 ± 2 hours. For the <i>Listeria</i> test, 25 g of the sample were placed with 225 ml of Half-fraser broth at room temperature and incubated at 30°C for 25 h. 		
16/4/2024	<p>Test T0:</p> <ul style="list-style-type: none"> Control of the final inoculation and inoculation of the samples using a McFa device. Then the mother cocktail was diluted and inoculated on plates to ensure that it actually contains Log 9. Dilution levels: 7, 8, 9. Incubation 37°, 24 h. Inoculation with <i>L. innocua</i> of the yogurt mixtures was carried out. The yogurt was divided into a total of 4 batches (500 g) of 100 g Stomacher bags (20 Stomacher bags in total). The batches that should contain <i>Listeria</i> were inoculated by adding 100 µl of the -4 dilution to the Stomacher bags and shaken at 230 	9	




<p>UNIVERSIDAD NACIONAL COSTA RICA</p>	<p>for 1 min to achieve uniform distribution of the inoculate. The bags were stored in the refrigerator at 6 °C for the following examination points.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determination of the total number of bacteria. For the total count of bacteria, 10 g of sample was placed with 90 ml of peptone NaCl and dilutions from -2 to -7 were prepared, then they were placed on Agar for total count of bacteria and duplicate, incubated for 72 hours at 30°C. • Quantitative Listeria test: The sample was mixed with NaCl peptone. Dilution levels are performed: 0 (3x 0.33 ml), -1, -2, 0.1 ml of the selected dilution levels were added to each Listeria Brilliance plate in duplicate. The original sample was divided into 3 plates of 0.333 ml each to increase the detection limit. The plates were placed with the lid down in the incubator at 37°C for 48 h. • Qualitative evaluation of Listeria the sample was mixed with medium Fraser broth at room temperature, homogenized [230 rpm, 30 s] and incubated at 30 °C for 25 h . • Technological studies (with non-inoculated samples): Determination of the pH value and Determination of the aw value. <p>Diary cheese sampling is continued: samples 34-35-36-37-38-39.</p> <ul style="list-style-type: none"> • For the detection of <i>Bacillus</i>: Analysis of the 3 COL S. Isolation of the different colonies on new Col S plates, and then incubated at 37°C for 24 hrs. • For the <i>Enterobacteriaceae</i>: Collection of colonies for confirmation then incubated on a non-selective nutrient agar for 24 h at 37 °C. • For the <i>E. coli</i> detection test: Evalua- 	
--	--	--



<p>UNIVERSIDAD NACIONAL COSTA RICA</p>	<p>of the plates.</p> <ul style="list-style-type: none"> • For the <i>Salmonella</i> test the samples placed in buffered peptone water were inoculated in tubes with 0.1 m of the broth with 10 ml. of RVS broth (incubated at 41.5 °C for 24 hrs +3) and 1 ml was transferred into a test tube with broth of MKTTn and incubated (34-38 °C for 24 ± 3 hrs). • For the <i>Listeria</i> detection test, 0.1 ml of the incubated and enriched Half-Fraser broth sample was transferred to 10 ml of Fraser broth and incubated at 37°C for 24 hours. The surface of a Listeria Brilliance plate was inoculated with Half-fraser broth and incubated at 37°C for 48 h. The same procedure is repeated for the Palcam plates.. 	
<p>17/4/2024</p>	<p>Test T0:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Quantitative analysis of listeria: Evaluation of quantitative Listeria Brilliance plates. • Qualitative evaluation of listeria: 0.1 ml of incubated and enriched Fraser broth medium was transferred to 10 ml of Fraser broth and incubated at 37°C for 24 hours. Half of the Fraser broth was then inoculated onto the surface of a Listeria Brilliance plate and incubated at 37°C for 48 hours. The same was repeated for Palcam plates. <p>Diary cheese sampling is continued: samples 34-35-36-37-38-39.</p> <ul style="list-style-type: none"> • For the detection of <i>Bacillus</i>: native, gram stains, catalase and oxidase tests as a way of identification of the isolated bacterias were carried out. • For the <i>Enterobacteriaceae</i>: Performing the oxidase test on suspicious colonies. Suspicious colonies were transferred to a tube containing an OF glucose medium and incubated for 24 h at 37 °C. 	<p>8</p> <p><i>Handwritten signature</i></p>



UNA
UNIVERSIDAD NACIONAL
COSTA RICA

	<ul style="list-style-type: none"> For the <i>Salmonella</i> detection test: the surface of an XLD plate and a Brilliance <i>Salmonella</i> plate were inoculated with the culture obtained in the RVS broth. Also the surface of an XLD plate and a Brilliance <i>Salmonella</i> plate were inoculated with the culture obtained in the MKTTn broth. Both with duplicate. The plates were incubated for 24 ± 3 hours at 34-38 °C. For the <i>Listeria</i> detection test: The surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate was inoculated with Fraser broth and incubated at 37°C for 48 h. The same procedure was repeated for the Palcam plates. Both with duplicate. 		
18/4/2024	<p>Test T0:</p> <ul style="list-style-type: none"> Quantitative analysis of <i>Listeria</i>: Evaluation of quantitative <i>Listeria</i> Brilliance plates. Qualitative assessment of <i>Listeria</i>: Fraser broth was inoculated onto the surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate using an eyelet to create well-defined individual colonies and incubated at 37°C for 48 hours. The same was repeated for Palcam plates. <p>Diary cheese sampling is continued; samples 34-35-36-37-38-39.</p> <ul style="list-style-type: none"> For the total count of bacteria: Analysis of PC plates. For the <i>Enterobacteriaceae</i>: Evaluation of the glucose tube. For the <i>Salmonella</i> detection test: Evaluation of the plates and other confirmatory tests of suspicious colonies were performed, such as serological examination and performance of an API. For the <i>Listeria</i> detection test: Half-fraser plates were evaluated for the <i>Listeria</i> detection test. 	8	

UNA
UNIVERSIDAD NACIONAL
COSTA RICA

19/4/2024	<ul style="list-style-type: none"> Determination of the total number of bacteria: Evaluation of PC plates for the total number of bacteria. Qualitative evaluation of <i>Listeria</i>: Evaluation of Half-Fraser plate. <p>Test T3:</p> <ul style="list-style-type: none"> Quantitative <i>Listeria</i> test: The sample was mixed with NaCl peptone. Dilution levels are performed; 0 (3x 0.33 ml), -1, -2. 0.1 ml of the selected dilution levels were added to each <i>Listeria</i> Brilliance plate in duplicate. The original sample was divided into 3 plates of 0.333 ml each to increase the detection limit. The plates were placed with the lid down in the incubator at 37°C for 48 h. Technological studies (with non-inoculated samples): Determination of the pH value and Determination of the aw value. <p>Diary cheese sampling is continued; samples 34-35-36-37-38-39.</p> <ul style="list-style-type: none"> For the <i>Listeria</i> detection test: Evaluation of the <i>Listeria</i> Brilliance and Palcam plates from the Fraser broth. Additional tests were made to confirm for suspicious colonies: Microscopic appearance, Beta-hemolysis, Catalase, Mobility test, CAMP test 	8	
22/4/2024	<p>Test T0</p> <ul style="list-style-type: none"> Qualitative evaluation of <i>Listeria</i> from Fraser plates <p>Test T3</p> <ul style="list-style-type: none"> Quantitative <i>Listeria</i> analysis of <i>Listeria</i> Brilliance quantitative plates. 	8	
23/4/2024	<p>Test T7</p> <ul style="list-style-type: none"> Determination of the total number of bacteria. For the total count of bacteria, 10 g of sample was placed with 90 ml of peptone NaCl and dilutions until -7 were prepared, then they were placed on Agar for total 	8	

	<p>count of bacteria and duplicate, incubated for 72 hours at 30°C.</p> <ul style="list-style-type: none"> Quantitative <i>Listeria</i> test: The sample was mixed with NaCl peptone. Dilution levels are performed: 0 (3x 0.33 ml), -1, -2, -3. 0.1 ml of the selected dilution levels was added to each <i>Listeria</i> Brilliance plate in duplicate. The original sample was divided into 3 plates of 0.333 ml each to increase the detection limit. The plates were placed with the lid down in the incubator at 37°C for 48 h. Qualitative evaluation of <i>Listeria</i> the sample was mixed with medium Fraser broth at room temperature, homogenized [230 rpm, 30 s] and incubated at 30 °C for 25 h. Technological studies (with non-inoculated samples): Determination of the pH value and Determination of the aw value. 		
24/4/2024	<p>Test T7</p> <ul style="list-style-type: none"> Quantitative analysis of <i>Listeria</i> is performed through the evaluation of quantitative <i>Listeria</i> Brilliance plates. Qualitative evaluation of <i>Listeria</i> is performed. 0.1 ml of the incubated and enriched Fraser broth medium was transferred to 10 ml of Fraser broth and incubated at 37°C for 24 hours. Fraser broth was then inoculated onto the surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate using an eyelet to create well-defined individual colonies and incubated at 37°C for 48 hours. The same was repeated for Palcam plates. 	8	
25/4/2024	<p>Test T7</p> <ul style="list-style-type: none"> A quantitative analysis of <i>Listeria</i> was performed. Analysis of quantitative plates of <i>Listeria</i> Brilliance. A qualitative evaluation of <i>Listeria</i> was performed. Fraser broth was inoculated onto the surface of a 	8	

	<p><i>Listeria</i> Brilliance plate using an eyelet to create well-defined single colonies and incubated at 37°C for 48 hours. The same is repeated for Palcam plates.</p>		
26/4/2024	<p>Test T7</p> <ul style="list-style-type: none"> Determination of the total number of bacteria by evaluating the PC plates for the total number of bacteria. Qualitative evaluation of <i>Listeria</i> by observation of Half-Fraser plates Analysis of data <p>The sampling of vegan yogurts was repeated with samples contaminated due to malfunction of the incubator: (samples 25-26-27). For the total count of bacteria, 10 g of sample was placed with 90 ml of peptone NaCl and dilutions from -1 to -9 were prepared, then they were placed on Agar for total count of bacteria and duplicate, incubated for 72 hours at 30°C.</p> <p>The <i>Listeria</i> inoculation challenge test began with vegan and dairy cheeses to compare which matrix best allows the growth of <i>Listeria</i>. Cryoculture cultivation was carried out for inoculation. For the strain cocktail, 1 cryoculture bead (-80 °C) of the selected strains was fractionated on Columbia blood agar with sheep blood and incubated at 37 °C for 24 hours. The Strains used: <i>L. innocua</i>: C DSM 20649 (Rinderhim), <i>Listeria innocua</i> IV 2.1 (Salat RIZ), <i>Listeria innocua</i> 146 (Zoonosen AG).</p>	8	
29/4/2024	<p>Test T7</p> <ul style="list-style-type: none"> Qualitative evaluation of <i>Listeria</i> from Fraser plates <p>The sampling of vegan yogurts was</p>	8	


	<p>tested with samples contaminated due to malfunction of the incubator. (samples 25-26-27). Analysis of the PC plates.</p> <p>Test Challenge of Vegan and diary cheeses</p> <p>Test T0:</p> <ul style="list-style-type: none"> Control of the final inoculation and inoculation of the samples using a McFa device. Then the mother cocktail was diluted and inoculated on plates to ensure that it actually contains Log 9. Dilution levels: 7, 8, 9. Incubation 37°, 24 h. Inoculation with <i>L. innocua</i> of the cheese mixtures was carried out. The cheese was divided into a total of 4 batches (500 g) of 100 g Stomacher bags (20 Stomacher bags in total). The batches that should contain <i>Listeria</i> were inoculated by adding 100 µl of the -4 dilution to the Stomacher bags and shaken at 230 rpm for 1 min to achieve uniform distribution of the inoculate. The bags were stored in the refrigerator at 6 °C for the following examination points. Determination of the total number of bacteria. For the total count of bacteria, 10 g of sample was placed with 90 ml of peptone NaCl and dilutions from -2 to -7 were prepared, then they were placed on Agar for total count of bacteria and duplicate, incubated for 72 hours at 30°C. Quantitative <i>Listeria</i> test: the sample was mixed with NaCl peptone. Dilution levels are performed: 0 (3x 0.33 ml), -1, -2. 0.1 ml of the selected dilution levels were added to each <i>Listeria</i> Brilliance plate in duplicate. The original sample was divided into 3 plates of 0.333 ml each to increase the detection limit. The plates were placed with the lid down in the incubator at 37°C for 48 h. 	
--	---	--

	<p>Qualitative evaluation of <i>Listeria</i> the sample was mixed with medium Fraser broth at room temperature, homogenized [230 rpm, 30 s] and incubated at 30 °C for 25 h .</p> <ul style="list-style-type: none"> Technological studies (with non-inoculated samples): Determination of the pH value and Determination of the aw value. 		
30/4/2024	<p>Test T0:</p> <ul style="list-style-type: none"> Quantitative analysis of listeria: Evaluation of quantitative <i>Listeria</i> Brilliance plates. Qualitative evaluation of listeria: 0.1 ml of incubated and enriched Fraser broth medium was transferred to 10 ml of Fraser broth and incubated at 37°C for 24 hours. Half of the Fraser broth was then inoculated onto the surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate and incubated at 37°C for 48 hours. The same was repeated for Palcam plates. 	8	g N.Z.
2/5/2024	<p>Test T0:</p> <ul style="list-style-type: none"> Quantitative analysis of <i>Listeria</i>: Evaluation of quantitative <i>Listeria</i> Brilliance plates. Qualitative assessment of <i>Listeria</i>: Fraser broth was inoculated into the surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate using an eyelet to create well-defined individual colonies and incubated at 37°C for 48 hours. The same was repeated for Palcam plates. Evaluation of Half-Fraser plate. 	8	g N.Z.
3/5/2024	<p>Test T0:</p> <ul style="list-style-type: none"> Determination of the total number of bacteria: Evaluation of PC plates for the total number of bacteria. Qualitative evaluation of listeria: Evaluation of Half-Fraser plate. <p>Test T3:</p> <ul style="list-style-type: none"> Quantitative <i>Listeria</i> test: The sample was mixed with NaCl peptone. Dilution levels are performed: 0 (3x 	8	g N.Z.


	<p>0.33 ml), -1, -2. 0.1 ml of the selected dilution levels were added to each <i>Listeria</i> Brilliance plate in duplicate. The original sample was divided into 3 plates of 0.333 ml each to increase the detection limit. The plates were placed with the lid down in the incubator at 37°C for 48 h.</p> <ul style="list-style-type: none"> Technological studies (with non-inoculated samples): Determination of the pH value and Determination of the aw value. 		
6/5/2024	<p>Test T0</p> <ul style="list-style-type: none"> Qualitative evaluation of <i>Listeria</i> from Fraser plates <p>Test T3</p> <ul style="list-style-type: none"> Quantitative <i>Listeria</i> analysis of <i>Listeria</i> Brilliance quantitative plates. 	8	N.F.
7/5/2024	<p>Test T7</p> <ul style="list-style-type: none"> Determination of the total number of bacteria. For the total count of bacteria, 10 g of sample was placed with 90 ml of peptone NaCl and dilutions until -7 were prepared, then they were placed on Agar for total count of bacteria and duplicate, incubated for 72 hours at 30°C. Quantitative <i>Listeria</i> test: The sample was mixed with NaCl peptone. Dilution levels are performed: 0 (3x 0.33 ml), -1, -2, -3. 0.1 ml of the selected dilution levels was added to each <i>Listeria</i> Brilliance plate in duplicate. The original sample was divided into 3 plates of 0.333 ml each to increase the detection limit. The plates were placed with the lid down in the incubator at 37°C for 48 h. Qualitative evaluation of <i>Listeria</i> the sample was mixed with medium Fraser broth at room temperature, homogenized [230 rpm, 30 s] and incubated at 30 °C for 25 h. Technological studies (with non-inoculated samples): Determination of the pH value and Determination of 	8	N.F.

	<p>the aw value.</p> <p>Test T7</p> <ul style="list-style-type: none"> Quantitative analysis of <i>Listeria</i> is performed through the evaluation of quantitative <i>Listeria</i> Brilliance plates. Qualitative evaluation of <i>Listeria</i> is performed. 0.1 ml of the incubated and enriched Fraser broth medium was transferred to 10 ml of Fraser broth and incubated at 37°C for 24 hours. Fraser broth was then inoculated onto the surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate using an eyelet to create well-defined individual colonies and incubated at 37°C for 48 hours. The same was repeated for Palcam plates. 	8	N.F.
8/5/2024	<p>Test T7</p> <ul style="list-style-type: none"> Determination of the total number of bacteria by evaluating the PC plates for the total number of bacteria. A quantitative analysis of <i>Listeria</i> was performed. Analysis of quantitative plates of <i>Listeria</i> Brilliance. A qualitative evaluation of <i>Listeria</i> was performed. Fraser broth was inoculated into the surface of a <i>Listeria</i> Brilliance plate and incubated at 37°C for 48 hours. The same is repeated for Palcam plates. Analysis of Half-fraser plates. Analysis of data 	8	N.F.
10/5/2024	<p>Test T7</p> <ul style="list-style-type: none"> Qualitative evaluation of <i>Listeria</i> from Fraser plates Analysis of data 	8	N.F.
13/5/2024	<ul style="list-style-type: none"> The milk samples received were tested both for the presence of bacteria that may indicate mastitis and for traces of antibiotics present that make the milk unsuitable for human consumption. Tests for determination of bacteria that grew from the milk samples of the clinic animals (KOH, Oxidase, 	8	N.F.
14/5/2024			

UNA

 UNIVERSIDAD NACIONAL COSTA RICA			
	Catalase, Staphylase, Coagulase, Culture in chromoculture agar, Ultraviolet light test in blood agar aesculin, pyrase, Serogroup B, serogroup C, Hipp test)		
	<ul style="list-style-type: none"> The milk samples received were tested both for the presence of bacteria that may indicate mastitis and for traces of antibiotics present that make the milk unsuitable for human consumption. Tests for determination of bacteria that grew from the milk samples of the clinic animals (KOH, Oxidase, Katalase, Staphylase, Coagulase, Culture in chromoculture agar, Ultraviolet light test in blood agar aesculin, pyrase, Serogroup B, serogroup C, Hipp test) 	8	
15/5/2024	<ul style="list-style-type: none"> The milk samples received were tested both for the presence of bacteria that may indicate mastitis and for traces of antibiotics present that make the milk unsuitable for human consumption. Tests for determination of bacteria that grew from the milk samples of the clinic animals (KOH, Oxidase, Katalase, Staphylase, Coagulase, Culture in chromoculture agar, Ultraviolet light test in blood agar aesculin, pyrase, Serogroup B, serogroup C, Hipp test) 	8	
16/5/2024	<ul style="list-style-type: none"> The milk samples received were tested both for the presence of bacteria that may indicate mastitis and for traces of antibiotics present that make the milk unsuitable for human consumption. Tests for determination of bacteria that grew from the milk samples of the clinic animals (KOH, Oxidase, Katalase, Staphylase, Coagulase, Culture in chromoculture agar, Ultraviolet light test in blood agar aesculin, pyrase, Serogroup B, serogroup C, Hipp test) MALDI toff for determination of bacteria previously grown on agar, through the use of technology using a laser to determine the molecular weight of the bacterial colony and determine which bacteria it is 	8	
17/5/2024	<ul style="list-style-type: none"> Field sampling is carried out for client's dairy. The swabs were taken to the laboratory for further examination. 	8	
21/5/2024	<ul style="list-style-type: none"> Diary cheese and Vegan cheese made from soy milk and nuts was created and in the dairy processing kitchen of 	8	

UNA

 UNIVERSIDAD NACIONAL COSTA RICA			
	the food microbiology department, under strict standards of good manufacturing practices and special care to HACCP so as not to affect the quality and safety of the product		
	<ul style="list-style-type: none"> In the case of the vegan product, several types of soy and almond-based milk were tested to determine which is most effective and safe when creating the subproducts. 	8	
22/5/2024	<ul style="list-style-type: none"> Diary cheese and Vegan cheese made from soy milk and nuts was created and in the dairy processing kitchen of the food microbiology department, under strict standards of good manufacturing practices and special care to HACCP so as not to affect the quality and safety of the product In the case of the dairy product, several types of milk with different fat concentrations were tested to determine which was most effective in creating a safe subproduct suitable for human consumption. 	8	
23/5/2024	<ul style="list-style-type: none"> Presentation of results of the project carried out to the Department of Dairy Hygiene and Quality and the Department of Food Microbiology 	5	
24/5/2024	Sampling tour in a livestock dairy for sampling and analysis of biological hazards that may affect the quality of the milk at the time of its collection.	8	
27/5/2024	<ul style="list-style-type: none"> Diary cheese and Vegan cheese made from soy milk and nuts was created and in the dairy processing kitchen of the food microbiology department, under strict standards of good manufacturing practices and special care to HACCP so as not to affect the quality and safety of the product 	8	
28/5/2024	Sampling tour in a livestock dairy for sampling and analysis of biological hazards that may affect the quality of the milk at the time of its collection.	8	
29/5/2024	Gram stain, observation of bacteria in saline, oxidase and catalase reactions for	5	

UNA

	client's sample, previously cultured on blood agar.		
	Total	598	

Anexo 9. Certificado del Instituto de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo), Hannover, Alemania

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
University of Veterinary Medicine Hannover



Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover

Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit

Dr. Johanna Vahle
PD Dr. Nadja Jeßberger
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Tel. +49 511 856-7517
Tel. +49 511 856-7547
Fax +49 511 856-827552
Johanna.Vahle@tiho-hannover.de
Nadja.Jessberger@tiho-hannover.de

Ihre Nachricht vom | Ihr Zeichen

Meine Nachricht vom | Mein Zeichen

Hannover, 10.06.2024

Attestation of internship: Lucia Alvarenga Castro

Ms. Lucia Alvarenga Castro interned as a trainee at the Department of Food Microbiology, Institute for Food Quality and Safety, University of Veterinary Medicine Hannover, from 01.02.2024 to 29.05.2024.

The Department of Food Microbiology comprises three main areas of activity. First, it is involved in teaching and training of veterinary students. Second, various research projects are conducted, for instance regarding bacterial biofilm formation and surface disinfection using plasma water, as well as thermal inactivation of pathogens at low temperatures. Finally, the service sector is an important part of the department. In the DAkkS-accredited laboratories, both foodstuffs and consumer goods are tested for hygiene indicators and foodborne pathogens.

Here she acquired experience in the routine testing of food samples in accordance with official standards as well as good microbiological practice. After her initial training, Ms. Alvarenga Castro was assigned her own research project on microbiological safety of vegan yoghurt and cheese alternatives. Her responsibilities included development, implementation and evaluation of the microbiological investigations. In addition to determining the microbiological status of the products, she also carried out challenge tests to investigate growth and persistence of *Listeria innocua* as a surrogate organism for *Listeria monocytogenes*.

Ms. Alvarenga Castro completed her assigned tasks to our complete satisfaction, showing the utmost care and initiative. Within a very short time, she was able to plan, carry out and evaluate her scientific experiments independently and with ease. She documented test results clearly and presented them confidently in a final oral presentation.

Ms. Alvarenga Castro integrated fast and very well into our team. She was a friendly, valued, well-liked trainee and an enrichment to the department. Furthermore, she addressed concerns or problems directly, objectively and in a solution-oriented manner.

We thank Ms. Alvarenga Castro for her work in the department and are happy to welcome her back at any time. In the meantime, we wish her all the best for her career.

Dr. Johanna Vahle

PD Dr. Nadja Jeßberger

1 / 2



Die Akkreditierung gilt für alle in der
Urkunde aufgeführten Prüfverfahren.

Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Steuer-Nr. 25/202/26506
LPO-Nr. 01 233060165

Bankverbindung
Norddeutsche Landesbank Hannover
IBAN DE66 2505 0000 0106 0312 55
SWIFT-BIC: NOLA DE 2H

www.tiho-hannover.de

2 / 2