



UNIVERSIDAD DEL AZUAY

Facultad de Ciencia y Tecnología

Escuela de Ingeniería en Alimentos

**Elaboración de una guía de control microbiológico para las
micro y pequeñas empresas lácteas y cárnicas del cantón
Cuenca.**

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos

Autoras:

Andrea Fernanda León Placencia

Karla Alejandra Quesada Padrón.

Directora:

Rosa Cecilia Palacios Ochoa

Cuenca- Ecuador

2012

DEDICATORIA

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. Les dedico a mis Padres Alicia Placencia y Fernando León. A mis hermanos Christian, Paola, María y Miriam quien con su simpleza me ha ayudado a encontrar la luz cuando todo es oscuridad. A mí enamorado Francisco quien ha sido fuente de energía e inspiración en mi vida. A mis amigos Karla y Santiago por acompañarme en cada una de las locuras que he emprendido y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de este trabajo.

¡Gracias a ustedes!

Andrea León P.

DEDICATORIA

A mis padres Lucia y Francisco por creer en mí, por haberme inculcado siempre el deseo de superación, por su comprensión en los momentos difíciles de mi carrera y por el amor que me han dado a lo largo de mi vida. A mis hermanos Gabriela, Lucia y Francisco, por su compañía y apoyo desinteresado. A mis sobrinos Joaquín, Francisco, Juan José y Sebastián que son el tesoro máspreciado para mí. A mi esposo Pablo por brindarme su amor y ayuda incondicional en el transcurso de estos años. Gracias a ustedes hoy puedo alcanzar esta meta, les estaré eternamente agradecida.

Karla Quesada P.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente damos gracias a Dios, por habernos dado fuerza y valor para terminar estos estudios.

Agradecemos también la confianza y el apoyo de nuestros padres, hermanos y familiares, porque han contribuido positivamente para llevar a cabo esta difícil jornada.

Un agradecimiento muy especial, a la Doctora Cecilia Palacios, por su interés y dedicación en la dirección de este trabajo.

A todos los profesores de la Universidad que nos han asesorado, con sus valiosas aportaciones y nos ayudaron a crecer como personas y profesionales en especial a la Ingeniera Mónica Tinoco, Ingeniera Adriana Parra, Ingeniera María Fernanda Rosales e Ingeniero Claudio Sánchez.

Autoras

Handwritten signature and number 040612

RESUMEN

Los productos lácteos y cárnicos por su composición son un excelente medio para el desarrollo de microorganismos; sin embargo las micro y pequeñas empresas productoras de estos, desconoce cómo detectar a tiempo anomalías, identificar los agentes infecciosos y evitar que productos no inocuos salga al mercado.

El presente trabajo contiene información general sobre microbiología de los alimentos, haciendo énfasis en el control microbiológico de la carne, leche y sus derivados; además proporciona una orientación al personal relacionado con el aseguramiento de la calidad e inocuidad de alimentos, acerca de los procedimientos de muestreo, técnicas tradicionales y rápidas de análisis microbiológico de materias primas, productos terminados, superficies de contacto y ambientes.

PALABRAS CLAVES: Lote, Muestra, Muestreo, Patógeno, Técnica, Unidad de muestreo.

Dra. Cecilia Palacios

DIRECTORA DEL

Andrea León P.

ESTUDIANTE

Karla Quesada P.

ESTUDIANTE

TRABAJO DE GRADUACIÓN

Dra. Diana Chalco Q.

VOCAL

JUNTA ACADÉMICA

Ing. Marcelo Calle C.

VOCAL

JUNTA ACADÉMICA

Ing. Fausto Parra P.

DIRECTOR

JUNTA ACADÉMICA

Handwritten signature and number 04062

ABSTRACT

Dairy and meat products are excellent environments for the development of microorganisms; however the small and micro enterprises that produce these products are unaware of how to detect anomalies, identify infectious agents and prevent the marketing of these harmful products on time.

The present project contains general information on food microbiology emphasizing on the microbiological control of meat, milk, and by-products. In addition, it provides a personal orientation in relation with: the guarantee of food quality and safety, the sampling procedures, traditional and rapid techniques for the microbiological analysis of prime matter, finished products, contact surfaces and environments.

KEY WORDS: Lost, Samples, Sampling, Pathogen, Technique, Sampling unit.

Translated by,
Diana Lee Rodas

Dra. Cecilia Palacios
DIRECTORA DEL
TRABAJO DE GRADUACIÓN

UNIVERSIDAD DEL
AZUAY
DPTO. IDIOMAS

Andrea León P.
ESTUDIANTE

Karla Quesada P.
ESTUDIANTE

Dra. Diana Chalco Q.
VOCAL
JUNTA ACADÉMICA

Ing. Marcelo Calle C.
VOCAL
JUNTA ACADÉMICA

Ing. Fausto Parra P.
DIRECTOR
JUNTA ACADÉMICA

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN- PALABRAS CLAVES	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO	vii
INDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS	
1.1. Introducción	2
1.2. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA´s)	3
1.3. Vías de contaminación de los alimentos	4
1.4. Factores que influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos en los alimentos.	5
1.4.1. Factores intrínsecos	6
1.4.2. Factores extrínsecos	13
CAPÍTULO II: MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE Y LA CARNE	
2.1. Introducción	15
2.2. Microflora de la leche fresca	15
2.3. Microflora de la carne	17
2.4. Patógenos de las industrias lácteas y cárnicas.	19
2.4.1. Staphylococcus aureus	19
2.4.2. Escherichia coli	19
2.4.3. Escherichia coli O157 H7	20
2.4.4. Salmonella	21
2.4.5. Clostridium perfringens	23
2.4.6. Clostridium botulinum	23

	Pág.
CAPÍTULO III: CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LOS ALIMENTOS	
3.1. Introducción	24
3.2. Control de calidad requisito del Decreto 3253 (Buenas Prácticas de Manufactura)	24
3.3. Métodos de examen microbiológico	26
3.3.1. Planes de muestreo	26
3.3.2. Técnicas tradicionales de microbiología	30
3.3.3. Técnicas rápidas de microbiología	32
3.3.4. Otras técnicas actuales	36
CAPÍTULO IV: GUÍA DE MUESTREO Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO PARA LÁCTEOS Y CÁRNICOS	
4.1. Introducción	38
4.2. Requisitos microbiológicos de leche y productos lácteos	38
4.2.1. Leche cruda	38
4.2.2. Leche pasteurizada	39
4.2.3. Queso fresco	40
4.2.4. Yogur	40
4.2.5. Manjar	41
4.3. Requisitos microbiológicos de carne y productos cárnicos	41
4.3.1. Carne molida	41
4.3.2. Productos cárnicos crudos	42
4.3.3. Productos cárnicos curados- madurados	42
4.3.4. Productos cárnicos cocidos	43
4.3.5. Productos cárnicos precocidos congelados- Requisitos microbiológicos según norma INEN 1338:2010	44
4.4. Muestreo	45
4.4.1. Generalidades	45
4.4.2. Muestreo de lácteos	49
4.4.3. Muestreo de cárnicos	52
4.5. Equipos y materiales necesarios para realizar las técnicas de análisis.	55
4.6. Preparación de la muestra para el ensayo	56
4.7. Técnicas microbiológicas para el análisis de lácteos y cárnicos.	57
4.7.1. Técnicas microbiológicas tradicionales	57
a) Determinación de <i>Aerobios mesófilos</i> según norma INEN 18	57

	Pág.
b) Determinación de <i>Aerobios mesófilos</i> según norma INEN 1529-5	60
c) Determinación de <i>Coliformes totales</i> NMP/cm ³ según norma INEN 1529-6	64
d) Determinación de <i>Coliformes totales</i> REP UFC/cm ³ según norma INEN 1529-7	70
e) Determinación de <i>Coliformes fecales</i> y <i>Escherichia coli</i> según norma INEN 1529-8	74
f) Determinación de <i>Staphylococcus Aureus</i> según norma INEN 1529-14	85
g) Determinación de Mohos y levaduras según norma INEN 1529-10	96
h) Determinación de Salmonella según norma INEN 1529-15	100
i) Determinación de <i>Clostridium sulfito reductores</i> (<i>Clostridium Perfringens</i>) según norma INEN 1529-18	111
4.7.2. Técnicas microbiológicas rápidas	118
j) Determinación de <i>Aerobios mesófilos</i> con petrifilm	119
k) Determinación de <i>Coliformes totales</i> y <i>Escherichia coli</i> (UFC/g ó cm ³) con petrifilm	123
l) Determinación de <i>Staphylococcus Aureus</i> con petrifilm	126
m) Determinación de Mohos y levaduras con petrifilm	129
n) Determinación de Salmonella	132
o) Determinación de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	137

CAPÍTULO V: GUÍA DE MUESTREO Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO PARA AMBIENTES Y SUPERFICIES

5.1. Introducción	139
5.2. Requisitos microbiológicos de superficies de contacto	139
5.2.1. Requisitos microbiológicos de superficies inertes	139
5.2.2. Requisitos microbiológicos de superficies vivas, recipientes y objetos pequeños	141
5.3. Requisitos microbiológicos de ambientes	143
5.4. Muestreo	144
5.4.1. Muestreo de superficies	144
5.4.2. Muestreo de ambientes	151
5.5. Técnicas tradicionales y rápidas de análisis microbiológico de superficies	153
a) <i>Aerobios mesófilos</i>	153
b) <i>Coliformes totales</i>	153

	Pág.
c) <i>Staphylococcus aureus</i>	153
d) Mohos y levaduras	153
e) Salmonella	153
5.6. Técnicas tradicionales y rápidas de análisis microbiológico de ambientes	153

**CAPÍTULO VI: COSTOS PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE UN LABORATORIO
BÁSICO EN CUANTO A EQUIPOS Y MATERIALES SE REFIERE.**

6.1. Introducción	154
6.2. Cotizaciones	154
CONCLUSIONES	156
RECOMENDACIONES	157
BIBLIOGRAFIA	158

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Principales enfermedades de transmisión alimentaria.	3
Figura 2: Principales vías de contaminación de los alimentos.	4
Figura 3: Factores que influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos.	6
Figura 4: pH de algunos alimentos.	7
Figura 5: Actividad acuosa de algunos microorganismos.	10
Figura 6: Barreras y constituyentes antimicrobianos de alimentos.	12
Figura 7: Clasificación de los microorganismos en base a la temperatura.	14
Figura 8: Vía de contaminación fecal oral.	20
Figura 9: Recomendaciones para evitar el contagio con Salmonella.	22
Figura 10: Intoxicación por <i>Clostridium botulinum</i>	23
Figura 11: Clases de medios de cultivo.	30
Figura 12: Técnicas rápidas para el recuento de células viables.	33
Figura 13: Sistemas miniaturizados y kits de diagnóstico.	35
Figura 14: Equipo para Microelisa	36
Figura 15: Recomendaciones para el personal que realiza muestreo	45
Figura 16: Requisitos de los envases para muestreo	47
Figura 17: Métodos de esterilización	48
Figura 18: Métodos alternativos de esterilización	48
Figura 19: Procedimiento de muestreo para lácteos líquidos	51
Figura 20: Procedimiento de muestreo para lácteos sólidos	51
Figura 21: Procedimiento de muestreo para cárnicos congelados	52
Figura 22: Procedimiento de muestreo para carne	53
Figura 23: Procedimiento de muestreo para embutidos	54
Figura 24: Equipos y materiales	55
Figura 25: Preparación de la muestra para el ensayo	56
Figura 26: Procedimiento para la determinación de Aerobio mesófilos (Tiempo de Reducción del Azul de Metileno)	58
Figura 27: Procedimiento para la determinación de Aerobios mesófilos	61
Figura 28: Procedimiento para la determinación de Coliformes totales (NMP/cm ³)	65
Figura 29: Procedimiento para la determinación de Coliformes totales (REP/cm ³)	71
Figura 30: Procedimiento para la determinación de Coliformes fecales y E. coli	75
Figura 31: Procedimiento para la confinación de E.coli	76

	Pág.
Figura 32: Prueba confirmatoria IMVIC- Indol	77
Figura 33: Prueba confirmatoria IMVIC- Rojo de metilo	78
Figura 34: Prueba confirmatoria IMVIC- VP	79
Figura 35: Prueba confirmatoria IMVIC- Utilización del citrato	80
Figura 36: Procedimiento para la determinación de Staphylococcus Aureus	86
Figura 37: Siembra para la determinación de Staphylococcus Aureus	87
Figura 38: Recuento de colonias para la determinación de Staphylococcus Aureus	88
Figura 39: Selección y purificación de colonias para la determinación de Staphylococcus Aureus	89
Figura 40: Pruebas confirmatorias para Staphylococcus Aureus	90
Figura 41: Procedimiento para la determinación de Mohos y Levaduras	97
Figura 42: Procedimiento para la determinación de Salmonella	101
Figura 43: Pre-enriquecimiento para la determinación de Salmonella	102
Figura 44: Enriquecimiento para la determinación de Salmonella	103
Figura 45: Siembra en placa para la determinación de Salmonella	104
Figura 46: Selección y purificación de colonias para la determinación de Salmonella	106
Figura 47: Prueba de la ureasa	107
Figura 48: Prueba de la Lisina	108
Figura 49: Prueba de Voges.Proskauer	109
Figura 50: Confirmación serológica	110
Figura 51: Procedimiento para la determinación de Clostridium sulfito reductores	112
Figura 52: Siembra para la determinación de Clostridium sulfito reductores	113
Figura 53: Recuento de colonias para la determinación de Clostridium sulfito reductores	114
Figura 54: Pruebas confirmatorias para la determinación de Clostridium sulfito reductores	115
Figura 55: Manejo de placas petrifilm	118
Figura 56: Procedimiento para la determinación de Aerobios mesófilos utilizando Petrifilm	120
Figura 57: Procedimiento para la determinación de Salmonella utilizando la prueba rápida VIP	133
Figura 58: Pre- enriquecimiento para la determinación de Salmonella utilizando la prueba rápida VIP	134
Figura 59: Enriquecimiento para la determinación de Salmonella utilizando la prueba rápida VIP	135
Figura 60: Procedimiento para la determinación de E-coli O157H7 utilizando la prueba rápida VIP	138

	Pág.
Figura 61: Muestreo de superficies	145
Figura 62: Procedimiento de muestreo con el método del hisopo	146
Figura 63: Procedimiento de muestreo con el método de la esponja	147
Figura 64: Procedimiento de muestreo con el método del enjuague para recipientes	147
Figura 65: Procedimiento de muestreo con el método del enjuague para manos	148
Figura 66: Procedimiento de muestreo con el método del enjuague para objetos pequeños	149
Figura 67: Procedimiento de muestreo con Paletas de agar para análisis de superficies	150
Figura 68: Procedimiento de muestreo con placas Petrifilm para análisis de manos	150
Figura 69: Procedimiento de muestreo con placas Petrifilm para análisis de superficies	151
Figura 70: Procedimiento de muestreo de ambientes con Cajas Petri	152
Figura 71: Procedimiento de muestreo de ambientes con placas Petrifilm	152

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Requisitos microbiológicos de yogur	27
Tabla 2: Requisitos microbiológicos de carne molida	28
Tabla 3: Requisitos microbiológicos de leche cruda	39
Tabla 4: Requisitos microbiológicos de leche pasteurizada	39
Tabla 5: Requisitos microbiológicos de queso fresco	40
Tabla 6: Requisitos microbiológicos de yogur	40
Tabla 7: Requisitos microbiológicos de manjar	41
Tabla 8: Requisitos microbiológicos de carne molida	41
Tabla 9: Requisitos microbiológicos de productos cárnicos crudos	42
Tabla 10: Requisitos microbiológicos de productos cárnicos curados- madurados	43
Tabla 11: Requisitos microbiológicos de productos cárnicos cocidos	43
Tabla 12: Requisitos microbiológicos de productos cárnicos precocidos congelados	44
Tabla 13: Muestreo para unidades pequeñas	49
Tabla 14: Muestreo para unidades voluminosas	50
Tabla 15: Requisitos microbiológicos para superficies inertes- Muestreo mediante método del hisopo	140
Tabla 16: Requisitos microbiológicos para superficies inertes- Muestreo mediante método de la esponja	141
Tabla 17: Requisitos microbiológicos para superficies vivas, objetos pequeños y recipientes- Muestreo mediante método de enjuague	142
Tabla 18: Control Microbiológico del Aire	143

León Placencia Andrea Fernanda

Quesada Padrón Karla Alejandra.

Trabajo de Grado

Dra. Rosa Cecilia Palacios Ochoa

Junio del 2012

ELABORACIÓN DE UNA GUÍA DE CONTROL MICROBIOLÓGICO PARA LAS MICRO Y PEQUEÑAS EMPRESAS LÁCTEAS Y CÁRNICAS DEL CANTÓN CUENCA.

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de productos lácteos y cárnicos en el Ecuador y en la ciudad de Cuenca, exige a la industria alimentaria llevar a cabo un proceso seguro y de calidad, por lo que el Gobierno ha visto la necesidad de exigir el cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura a través del Reglamento 3253 para asegurar dichos procesos. Dentro del cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura se exige realizar un control de calidad en el cual se incluye al control microbiológico, por lo que es necesario aportar con una guía microbiológica para las 51 micro y pequeñas empresas lácteas y cárnicas del cantón Cuenca.

Esta guía proporciona ayuda de forma sencilla y detallada sobre los procedimientos para la toma, envío, transporte y preparación de las muestras; además de técnicas estándares y rápidas de análisis microbiológicos de productos, superficies y ambientes en función de los requisitos establecidos por el Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización (INEN), Normas legales de Perú y Norpacific S.A.

Al realizar controles microbiológicos las micro y pequeñas empresas podrán asegurar la inocuidad de sus alimentos, obtener el certificado de operación y competir en los mercados de hoy.

CAPÍTULO I

MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS

1.1. Introducción

Antiguamente se creía que las enfermedades eran provocadas por Dioses que castigaban a las personas enviándoles enfermedades que en ocasiones mataban a poblaciones enteras. Pero hoy en día ya se sabe que las enfermedades, en su mayoría, son producidas por microorganismos, que son células microscópicas invisibles al ojo humano.

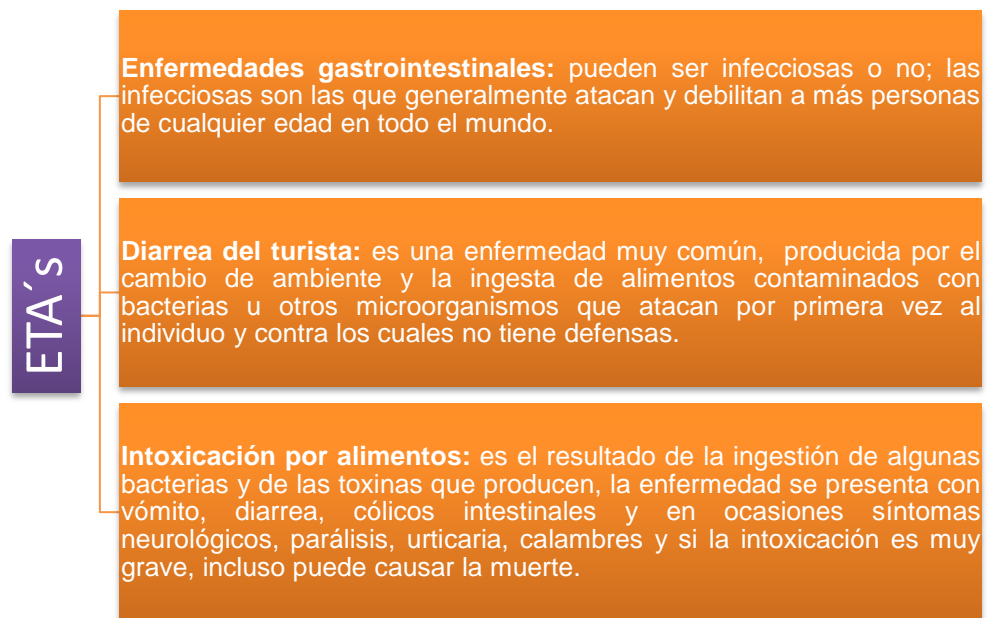
Algunos de ellos juegan un papel muy importante en la elaboración y conservación de los alimentos, mientras que otros son patógenos, es decir, que producen efectos adversos para la salud, de ahí radica la importancia del estudio de los efectos que pueden tener los microorganismos tanto en la salud del consumidor como en los alimentos. Por lo tanto, la microbiología de los alimentos abarca tres ámbitos específicos: la protección al consumidor frente a las enfermedades transmitidas por alimentos, la prevención de alteraciones en los alimentos y la transformación beneficiosa de un alimento por acción microbiana.

En vista de que es la salud del consumidor la que está en riesgo, las industrias alimentarias deben cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos y adoptar prácticas adecuadas de producción, elaboración, manipulación, envasado, almacenamiento y distribución de alimentos, con la finalidad de evitar en lo posible la transmisión de enfermedades a través de los mismos. Tanto los brotes de intoxicaciones alimentarias como la descomposición de las materias primas y de los productos terminados, por acción microbiana, acarrea graves repercusiones económicas a las industrias alimentarias. He aquí la importancia de realizar controles microbiológicos para detectar a tiempo anomalías, identificar los agentes infecciosos y evitar que productos no inocuos salga al mercado hasta que se tenga la seguridad de que son aptos para el consumo

1.2. Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's)

“La enfermedad transmitida por los alimentos ha sido definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como <<una enfermedad de carácter infeccioso o tóxico causada por, o que se cree que es causada por, el consumo de alimentos o de agua>>”. (Adams y Moss 2005). La mayoría de enfermedades transmitidas por alimentos son de origen microbiano, entre las principales se puede mencionar:

Figura 1: Principales enfermedades de transmisión alimentaria.



La leche, la carne roja, la de aves, los huevos y los productos derivados de todos ellos son los alimentos a los que comúnmente se les atribuye ser la causa de enfermedades de transmisión alimentaria. La distribución de un alimento contaminado o condiciones inadecuadas en las que se están preparando comidas para un elevado número de personas, por ejemplo en restaurantes, hoteles, hospitales, etc.; pueden provocar brotes de enfermedades. Existen diversas causas para que se produzcan estos, pero comúnmente se identifican deficiencias en el entrenamiento del personal y en los utensilios utilizados en el procesamiento de alimentos.

1.3. Vías de contaminación de los alimentos

Los microorganismos pueden encontrarse en una gran diversidad de hábitats, desde lo más frío en aguas de las regiones polares, hasta en aguas termales que se encuentran a temperatura de ebullición. Por lo tanto los alimentos pueden sufrir contaminaciones durante el proceso de manipulación, transporte, almacenamiento y distribución. En general las fuentes de contaminación son diversas, las principales se describen en la siguiente figura.

Figura 2: Principales vías de contaminación de los alimentos.



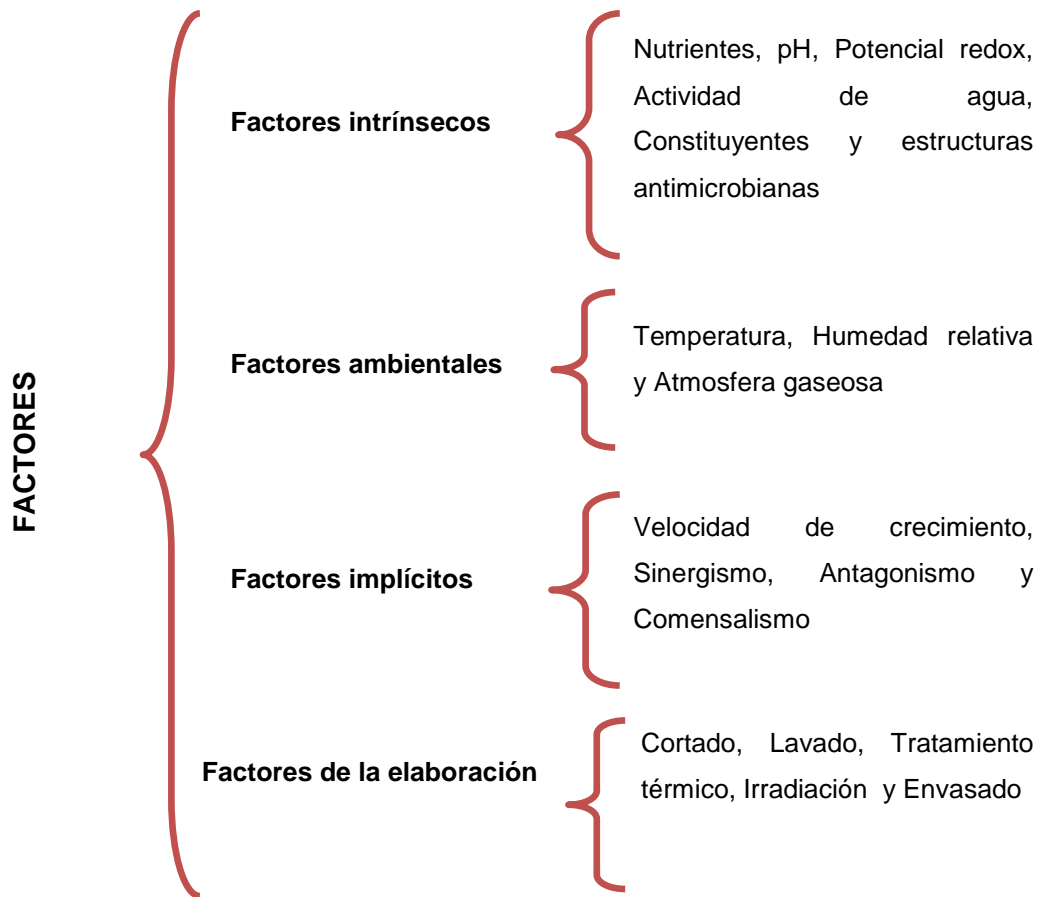
Con todo lo mencionado anteriormente se puede concluir que los alimentos no pueden ser estériles, sino que tienen una flora microbiana propia y adquieren una flora temporal proveniente del medio en el que se procesan, transportan, almacenan o distribuyen. Para garantizar la inocuidad de un alimento es fundamental destruir los microorganismos existentes en él, manipularlos, almacenarlos y distribuirlos adecuadamente de modo que el crecimiento de los mismos sea inhibido.

1.4. Factores que influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos en los alimentos.

Crecimiento microbiano es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo, para que exista crecimiento debe existir por lo menos una célula viva. Las poblaciones microbianas pueden llegar a ser muy grandes en corto tiempo por lo que es fundamental conocer las condiciones necesarias para el crecimiento y supervivencia de las mismas, con ello se podrá establecer la forma de controlar aquellos microorganismos que deterioran los alimentos y producen enfermedades; así como también se podrá determinar la manera de incentivar el crecimiento de los microorganismos que producen transformaciones beneficiosas en los alimentos.

Los factores que influyen en el crecimiento microbiano en los alimentos se han clasificado en 4 grupos, los mismos que se pueden observar en el siguiente cuadro.

Figura 3: Factores que influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos.

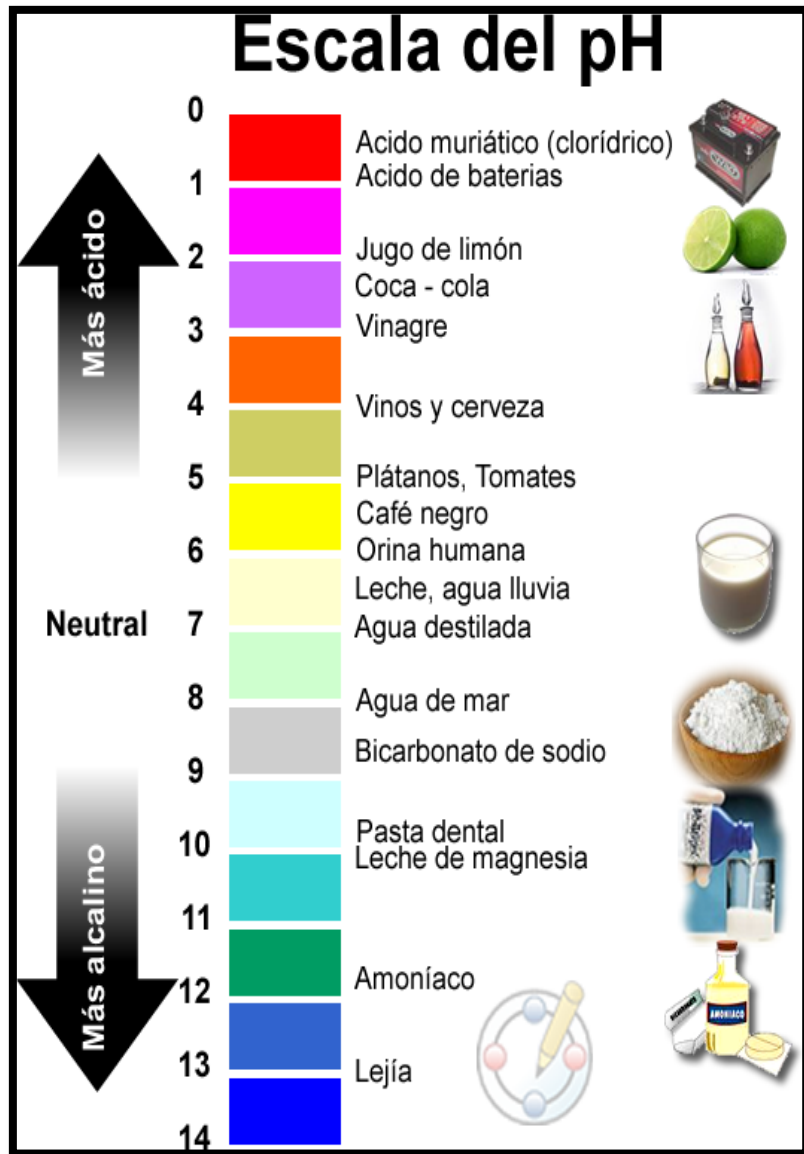


1.4.1. Factores intrínsecos

- **pH:** El pH de un alimento es uno de los principales factores intrínsecos que influyen en el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos.

“El pH de un alimento es la medida de su acidez o alcalinidad, teniendo en cuenta que la escala de pH comienza en cero y termina en 14; que una solución de pH de 7 es considerada como neutra, que los pH menores que 7 son considerados como ácidos y mayores como alcalinos”. (Carballo, 2008)

Figura 4: pH de algunos alimentos.



Fuente: http://www.hidroponiagdl.com/index.php?id_sec=102&t=3

Generalmente las frutas y verduras tienen pH ácido, es por ello que son alteradas principalmente por hongos y levaduras porque estos crecen a una escala de pH comprendida entre 3,5 a 4,0 y entre 4,5 a 6,0 respectivamente. Mientras que las bacterias crecen rápidamente a una escala de pH entre 6,0 y 8,0 por lo que atacan principalmente a productos que tengan un pH entre estos rangos como los lácteos, la carne, el pescado, los mariscos y ciertas hortalizas.

Foto 1: Frutas alteradas por microorganismos.



La mayoría de alimentos son ligeramente ácidos, ya que los productos cuyo pH es alcalino tienen un sabor desagradable, además la acidez en los alimentos limita el crecimiento microbiano, lo cual ha sido aprovechado para la conservación de los alimentos desde tiempos antiguos.

- **Contenido de nutrientes:** Los microorganismos utilizan los alimentos como fuente de nutrientes y de energía, de ellos obtienen elementos que son indispensables para su crecimiento como el agua, los carbohidratos, las vitaminas, los aminoácidos, las grasas, etc. La concentración de nutrientes puede determinar la velocidad de crecimiento bacteriano, es decir, si un nutriente que es indispensable para el microorganismo se termina, éste ya no podrá crecer.
- **Potencial redox:** Es la tendencia de un medio para aceptar o ceder electrones. El crecimiento microbiano en un alimento reduce su potencial redox, se dice que este efecto se lleva a cabo por que existe un agotamiento del oxígeno con la producción de hidrogeno por los microorganismos.

Los microorganismos aerobios estrictos es decir los que pueden vivir en presencia de oxígeno, tienen la necesidad de un potencial redox elevado o positivo, por lo que predominan en la superficie de los alimentos o en aquellas zonas en las que el aire pueda ser utilizado.

Los microorganismos anaerobios obligados, los que viven en ausencia de oxígeno, tienden a crecer en potenciales redox bajos o negativos, este tipo de microorganismos pueden vivir en la profundidad de los tejidos, en productos enlatados o envasados al vacío, etc. Para estos microorganismos el oxígeno genera un efecto tóxico.

Foto 2: Alimentos enlatados




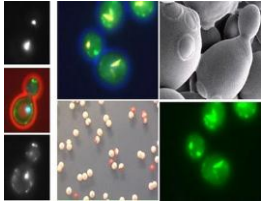

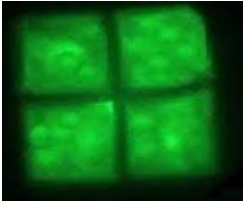
- **Actividad de agua (a_w):** Es una medida indirecta del agua que está disponible en un determinado alimento. La a_w de un alimento puede reducirse mediante la extracción del agua (deshidratación) o mediante la adición de solutos (salazonado, adición de azúcares, etc.).

Un pequeño descenso de la actividad de agua es suficiente para evitar la alteración de los alimentos, ya que la mayoría de los microorganismos crecen a niveles de a_w superiores a 0,90. Sin embargo, hay algunas excepciones, porque existen microorganismos que pueden multiplicarse a valores de a_w mucho más bajos, entre ellos tenemos los microorganismos:

- Halófilos que requieren sal para su proliferación,
- Xerófilos crecen bajo condiciones de sequedad es decir a actividades acuosas inferiores a 0,85 y

- Osmófilos los cuales crecen en hábitats con altas concentraciones de azúcares.

Figura 5: Actividad acuosa de algunos microorganismos.

	MICROORGANISMOS	AW
<p>Mayoría de bacterias</p>	<div style="text-align: center;">  <p>http://www.google.com.ec/imgres?q=bacterias&hl</p> </div>	<p>>0.90</p>
<p>Levaduras</p>	<div style="text-align: center;">  <p>http://www.google.com.ec/imgres?q=levaduras&hl</p> </div>	<p>>0.88</p>
<p>Mohos</p>	<div style="text-align: center;">  <p>http://www.google.com.ec/imgres?q=mohos&hl</p> </div>	<p>>0.80</p>
<p>Mohos halófilos</p>	<div style="text-align: center;">  <p>http://www.google.com.ec/imgres?q=mohos+halofilo</p> </div>	<p>>0.75</p>

Mohos Xerófilos		>0.61
Levaduras osmófilas		>0.60

<http://www.google.com.ec/imgres?q=mohos+xerófilos>

<http://www.google.com.ec/imgres?q=levaduras&hlosmolifilas>

- **Barreras y constituyentes antimicrobianos:** Los alimentos contienen sustancias que evitan las alteraciones microbianas entre los que se pueden destacar tenemos:

Figura 6: Barreras y constituyentes antimicrobianos de alimentos.



The figure consists of three photographs arranged horizontally at the top. The first photo shows fresh produce including corn cobs, green beans, and potatoes. The second photo shows a variety of spices and herbs on a white plate, including red onions, carrots, cinnamon sticks, and dried herbs. The third photo shows a glass of white milk on a saucer with three brown eggs.

EL TEGUMENTO	CONSTITUYENTES DE LOS TEJIDOS VEGETALES	PRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL
<p>Tiene una gran resistencia a la degradación y contiene compuestos antimicrobianos.</p> <p>Es importante que los alimentos sean manipulados y transportados de manera correcta, para evitar que el tegumento sufra daños físicos, porque si esto sucede los microorganismos podrán atacar el interior del alimento y deteriorarlo rápidamente.</p>	<p>Los pigmentos, alcaloides y resinas tienen propiedades antimicrobianas, pero se hallan presentes en cantidades excesivamente bajas, por lo que no son una garantía de inocuidad.</p> <p>Algunas plantas que se utilizan para condimentar alimentos también poseen actividad antimicrobiana, entre estas tenemos el ajo, mostaza, orégano, apio, canela, laurel, jengibre, cebolla, culantro, perejil, romero, etc.</p>	<p>Algunos productos de origen animal como la clara de huevo de gallina y la leche también contienen constituyentes antimicrobianos.</p>

1.4.2. Factores extrínsecos

- **Humedad relativa (HR):** La humedad relativa se relaciona con la actividad acuosa y es sumamente importante en el almacenamiento de los alimentos, porque “cuando se almacenan alimentos que tienen una actividad acuosa baja en una atmósfera de humedad relativa elevada, el agua pasará desde la fase gaseosa al alimento” (Adams y Moss, 2005) favoreciendo así el desarrollo de microorganismos y viceversa, si se almacenan alimentos que tienen actividad acuosa alta en un ambiente con humedad relativa baja, el alimento perderá humedad.
- **Atmósfera gaseosa:** El oxígeno es el gas más importante que se encuentra en contacto con los alimentos, su influencia en el potencial redox es un determinante importante de los microorganismos que se desarrollan y de su velocidad de crecimiento. Además del oxígeno existen otros gases que se utilizan en el proceso de elaboración de alimentos, entre ellos se puede destacar al dióxido de carbono (CO_2) empleado en el envasado de alimentos, el cual tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los microorganismos.

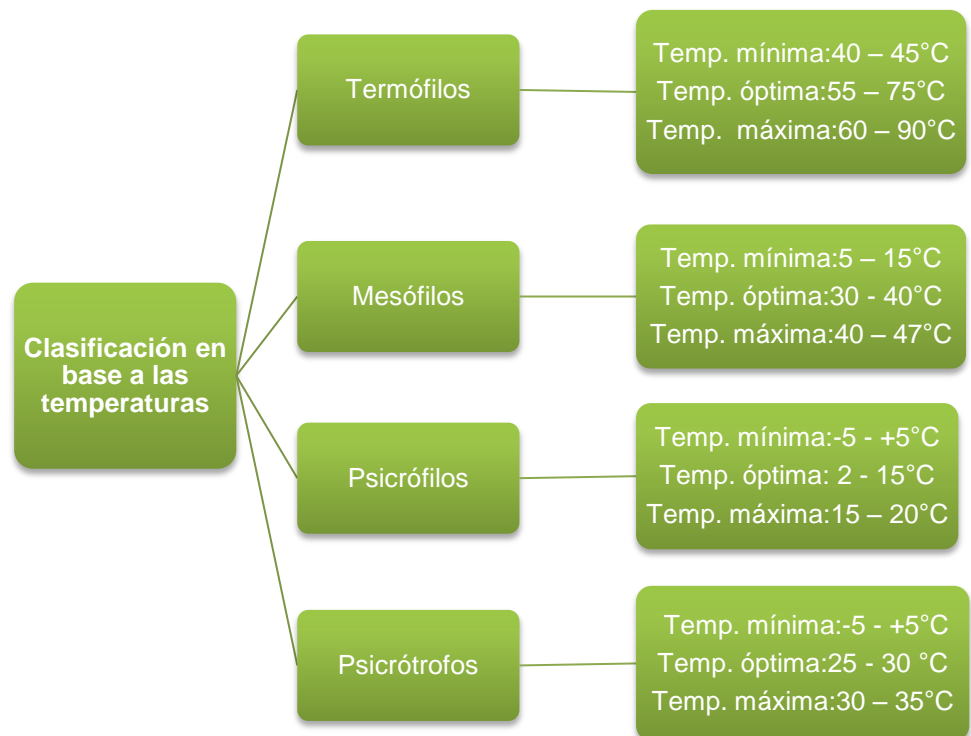
Foto 3: Embutidos envasados con atmósfera modificada.



Fuente: <http://mundodelacarne.blogspot.com/2010/04/emaques-con-atmosfera-modificada.html>

- **Temperatura:** La temperatura del ambiente es uno de los factores extrínsecos que tienen mayor impacto sobre la supervivencia y crecimiento microbiano, y por lo tanto sobre la conservación del producto. Los microorganismos crecen dentro de un intervalo de temperatura comprendido entre -8°C y 100°C , pero ningún microorganismo puede de crecer a todas las temperaturas de ese rango. En base a las temperaturas de crecimiento los microorganismos pueden ser clasificados en 4 grupos como se puede observar en la siguiente figura.

Figura 7: Clasificación de los microorganismos en base a la temperatura.



A medida que la temperatura disminuye o aumenta a partir de la óptima, la velocidad de crecimiento se hace más lenta y cualquier temperatura por encima de la máxima o por debajo de la mínima de crecimiento de un determinado microorganismo resulta letal para el mismo.

CAPÍTULO II MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE Y LA CARNE

2.1. Introducción

Todos los alimentos están expuestos a sufrir deterioro, que es una alteración de la composición química y de las propiedades nutritivas y sensoriales de un alimento. El deterioro de los alimentos se debe a tres causas: físicas (por acción de la luz, del calor, del frío, de la evaporación y de la desecación), químicas (reacciones de pardeamiento y acción enzimática) y microbiológicas (bacterias, hongos y levaduras). Este último es un factor de gran importancia, ya que la mayor parte de las alteraciones de los alimentos son consecuencia de la actividad microbiana, la cual modifica las cualidades del alimento volviéndolo inaceptable repentinamente y convirtiéndolo en riesgo potencial para la salud del hombre. Por esa razón es fundamental conocer los aspectos microbiológicos de la leche y de la carne, haciendo especial hincapié en el deterioro de las mismas.

2.2. Microflora de la leche fresca

La leche está compuesta principalmente por agua, grasa, proteína y lactosa; esta composición varía entre las diferentes especies y de igual forma entre las razas de una misma especie. Por su elevado contenido de nutrientes, su alta actividad acuosa y pH cercano a la neutralidad, la leche es un excelente medio para el crecimiento microbiano, por lo que es indispensable que durante las actividades de ordeño, transporte, procesamiento, almacenamiento y distribución se acaten estrictas normas de higiene.

La leche obtenida de vacas sanas y en condiciones asépticas contiene pocos microorganismos, los que comúnmente se encuentran son: Micrococos, Estreptococos y *Corynebacterium bovis*; mientras que si la vaca presenta la enfermedad conocida

como mastitis, la leche obtenida de ésta tendrá un elevado contenido de microorganismos.

“Los organismos más importantes que pueden producir mastitis son: *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Pseudomona aeruginosa* y *Corynebacterium pyogenes*. Los tres primeros son patógenos humanos y también en ocasiones han sido citados como agentes de mastitis algunos otros patógenos humanos como, por ejemplo, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*” (Adams y Moss, 2005). El tratamiento para la mastitis es a base de antibióticos, por lo que la leche de estas vacas no es apta para el consumo, ni para procesos de fabricación, ya que posee residuos de antibióticos.

Foto 4: Ordeño manual



Los principales microorganismos encontrados en la leche cruda provienen del interior de la ubre, del exterior de los pezones, de las pezoneras, de las tuberías de conducción de la leche, de los tanques de almacenamiento y de otros materiales utilizados para la manipulación de la leche. Por esta razón, es de suma importancia llevar a cabo actividades de limpieza y sanitización eficaces, por ejemplo para reducir la contaminación de la leche desde el exterior de la ubre se debe: retirar las heces y orina de los establos al menos dos veces al día, rasurar la ubres, recortar las colas, mantener limpio el suelo donde se realice el ordeño y lavar los pezones con agua caliente y desinfectante.

Foto 5: Ordeño mecánico



Fuente: <http://www.cuencarural.com/lecheria/74765-frecuencia-de-ordeno/>

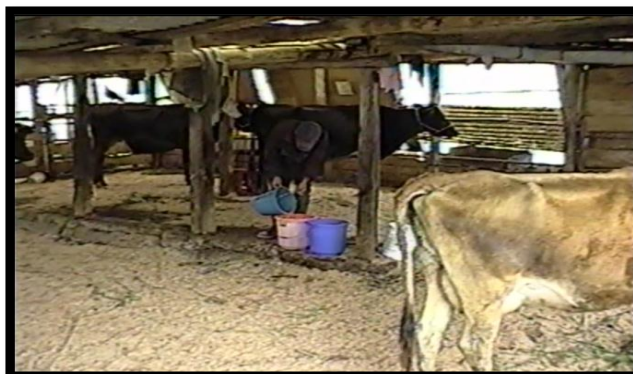
Inmediatamente luego de que la leche salga de la vaca esta debe ser refrigerada para evitar la proliferación de microorganismos y mantenerla bajo estas condiciones hasta que sea utilizada. Para que la leche sea apta para el consumo humano debe someterse a un tratamiento térmico cuyo objetivo principal es la destrucción de los microorganismos causantes de enfermedades y de aquellos microorganismos que pueden alterar el producto.

2.3. Microflora de la carne

Desde tiempos remotos la carne ha formado parte de la dieta del hombre, está compuesta por fibras musculares que contienen agua, proteína, grasa, carbohidratos, minerales y vitaminas. La carne por ser rica en nutrientes y tener un elevado contenido de agua es un medio excelente para el desarrollo microbiano.

“Los órganos internos y los músculos de una canal recién obtenida por sacrificio del animal deben estar relativamente exentos de microorganismos. El número de microorganismos hallados en muestras de tejidos obtenidas asépticamente suele ser superior a 10 ufc kg^{-1} , aunque existen testimonios de que su número puede aumentar en los estados de estrés y, naturalmente, su número será mayor si el animal está padeciendo una infección”. (Adams y Moss, 2005)

Foto 6: Animales en establo



El cuero y el tracto gastrointestinal son las principales fuentes de contaminación de la carne, por su elevado contenido de microorganismos. En el cuero del animal se puede encontrar Micrococos, Estafilococos, Pseudomonas, Mohos y Levaduras; esto se debe a que está en contacto permanente con el suelo, orina y heces. Estos pueden pasar a la carne por una inadecuada manipulación o por los utensilios utilizados para el faenamiento, por lo que un adecuado aseo del animal previo a la matanza del mismo, ayudará a disminuir el contenido microbiano. Las vísceras (hígado, corazón, riñones, pulmones, estomago, intestinos, etc.) contienen una elevada carga microbiana, por lo que es indispensable manejarlas con cuidado para evitar la contaminación de la carne con el contenido de las mismas.

Foto 7: Preparación de los cerdos para el faenado



Fuente: <http://inforhida1102pcb4.blogspot.com/2010/11/proceso-academico-del-bimestre-3.html>

Posterior al sacrificio de cualquier animal las canales deben ser lavadas, desinfectadas e inmediatamente sometidas a refrigeración o congelación. Para la desinfección generalmente se utilizan ácidos orgánicos, el más utilizado en la industria alimentaria es el ácido láctico que ayuda a reducir eficazmente la carga microbiana.

2.4. Patógenos de las industrias lácteas y cárnicas.

La leche y la carne son alimentos complejos y también un medio de cultivo excelente para el crecimiento de una variedad de microorganismos patógenos. A continuación se describirá brevemente cada uno de ellos.

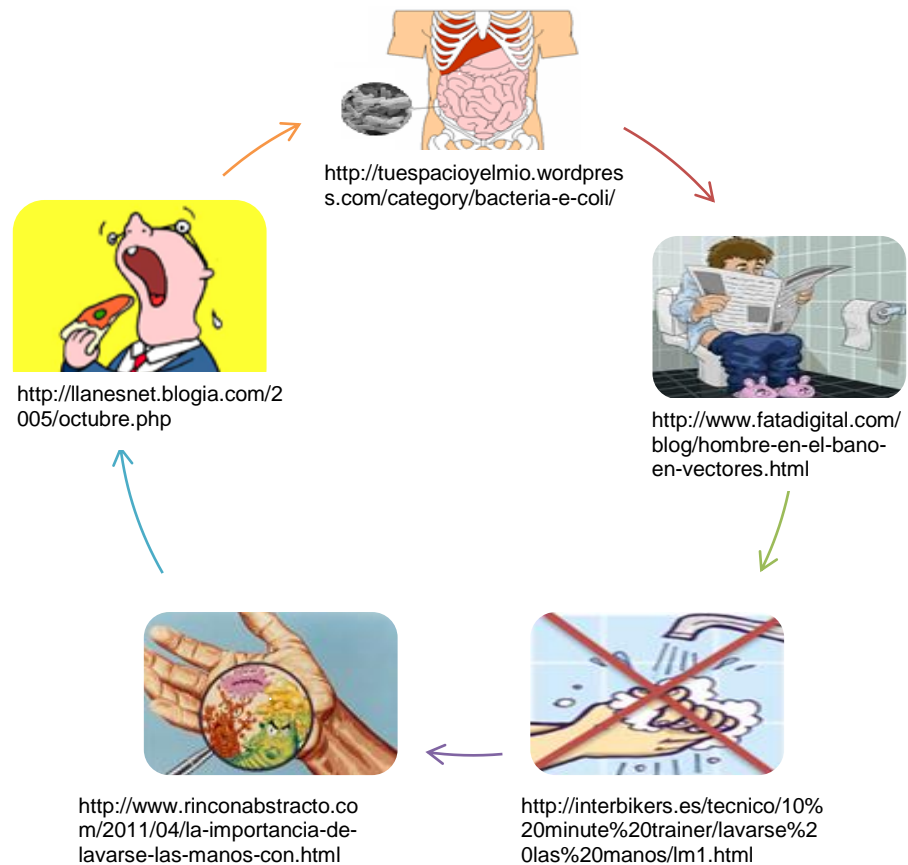
2.4.1. Staphylococcus aureus: Los seres humanos son los principales portadores de esta bacteria, la cual se encuentra principalmente en la piel, nariz y garganta. Esta bacteria produce una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas hasta enfermedades peligrosas como osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis y neumonía. También puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física del microorganismo o por la ingesta de la toxina que produce.

El jamón, salami, ensaladas de pollo y huevo, productos de panadería rellenos de nata, helados y lácteos no pasteurizados pueden ser los vehículos de transmisión de esta bacteria por lo que es necesario evitar la contaminación cruzada en la elaboración de los alimentos, almacenarlos a bajas temperaturas y cocinar bien los alimentos antes de su consumo.

2.4.2. Escherichia coli: Se encuentra en el intestino del hombre y de los animales, por ello es considerado como un indicador de contaminación fecal. Es transmitido al consumir alimentos contaminados con heces como por ejemplo hortalizas crudas, agua, productos lácteos no pasteurizados y carne poco cocida. Esta bacteria produce infecciones intestinales que afectan principalmente a los grupos más vulnerables, sus síntomas son malestar general, diarrea, falta de apetito, dolores abdominales y en ocasiones vómitos.

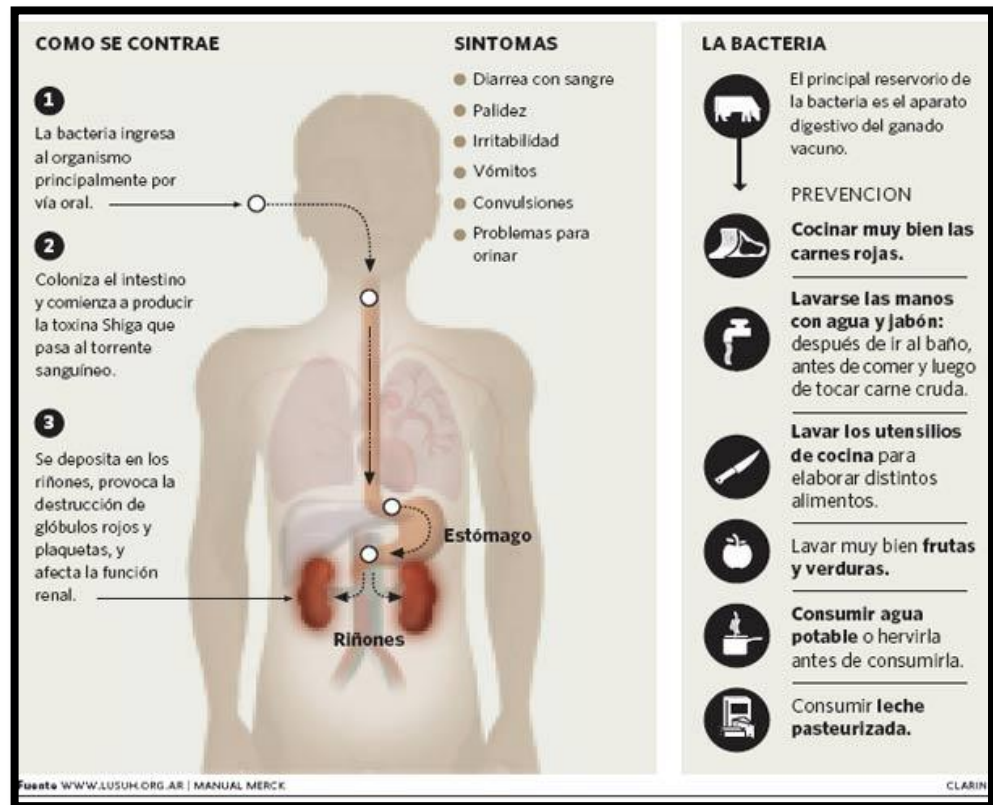
La *Escherichia coli* también puede producir enfermedades graves como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía.

Figura 8: Vía de contaminación fecal oral.



2.4.3. Escherichia coli O157 H7: Es una cepa enterohemorrágica de la bacteria *Escherichia coli*, produce una toxina que provoca intoxicación alimentaria, se transmite a través de la vía fecal oral, al consumir agua contaminada, leche cruda y carne poco cocida. La enfermedad se presenta con una diarrea hemorrágica y en ocasiones provoca falla renal especialmente en infantes y ancianos.

Foto 8: Intoxicación causada por *Escherichia coli* O157 H7.



Fuente: <http://www.taringa.net/posts/noticias/1970241/Muerte-por-sindrome-uremico-hemolitico.html>

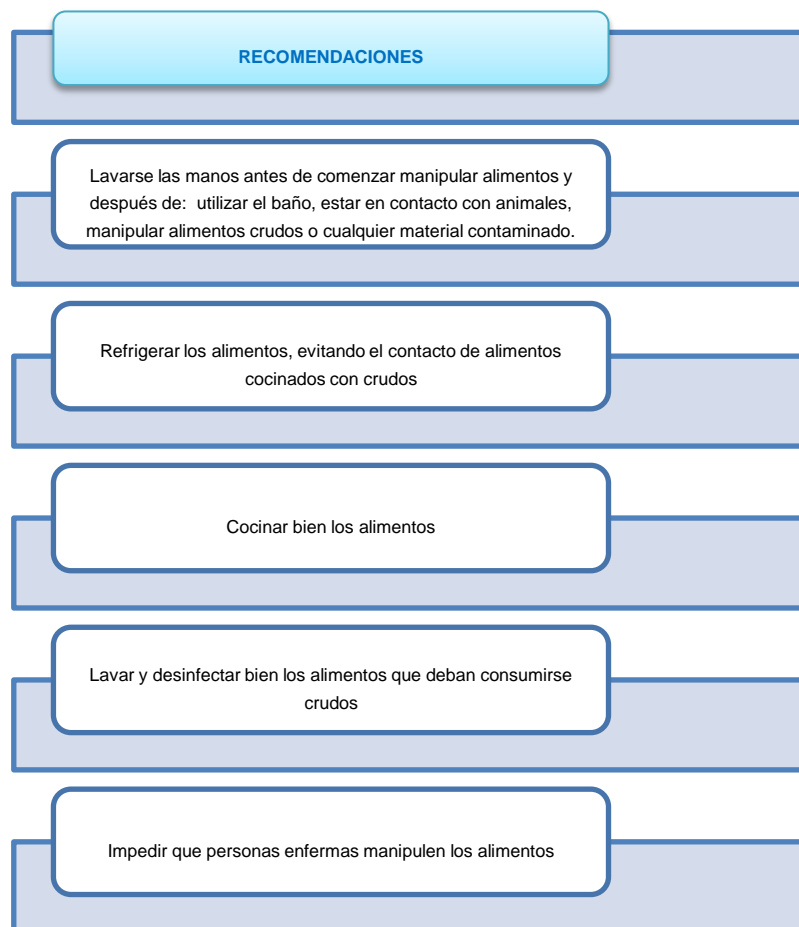
2.4.4. Salmonella: Se distinguen tres especies patógenas primarias: *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis* y *Salmonella Enteritidis*.

La salmonella se trasmite por la ingesta de productos lácteos, cárnicos, mariscos, hortalizas, aves de corral, huevos, chocolate, frutas, salsas y otros alimentos que hayan sido contaminados con materias fecales durante la manipulación y procesamiento de estos. Al ingresar al organismo producen bien una diarrea aguda, o bien una enfermedad clínica conocida como fiebre entérica, fiebre tifoidea o fiebre paratifoidea. Los síntomas principales son dolor de cabeza, falta de apetito, dolores abdominales, náuseas, vómitos, fiebre y diarrea acuosa. Si esta bacteria invade la sangre de la persona puede producir enfermedades más

severas como artritis, abscesos en diferentes partes del cuerpo, inflamación de la vesícula y riñones, endocarditis, pericarditis y en ocasiones meningitis.

Cabe mencionar que la persona que haya contraído salmonelosis puede convertirse en portador de Salmonellas si no recibe un tratamiento adecuado y si se trata de una persona que manipula alimentos, se convierte en un foco de contaminación, por lo que se recomienda que este personal sea excluido de las operaciones de manipulación de alimentos y se le asigne cualquier otra actividad en la que no tenga contacto con materias primas, superficies de contacto, producto en proceso, materiales de empaque y productos terminados.

Figura 9: Recomendaciones para evitar el contagio con Salmonella.



2.4.5. Clostridium perfringens: Es considerado como un indicador de contaminación fecal, se trasmite por el consumo de alimentos contaminados con tierra o con material fecal de hombres o animales; los brotes más frecuentes de intoxicación alimentaria por *Clostridium perfringens* se han dado por el consumo de carne y aves de corral cocinadas y recalentadas, ensaladas y hortalizas. Las toxinas que produce esta bacteria provocan intoxicaciones alimentarias, esta enfermedad se presenta con diarrea, náuseas y cólicos abdominales; otras enfermedades que puede provocar esta bacteria son la destrucción de la mucosa intestinal y la gangrena gaseosa que es la putrefacción del tejido cuya solución es la amputación de la zona afectada.

2.4.6. Clostridium botulinum: Esta bacteria se encuentra por lo general en la tierra, forma esporas que le permite sobrevivir y produce siete tipos de toxinas. Las toxinas producidas se destruyen con el calor, pero las esporas de esta bacteria son termoresistente, es decir que puede sobrevivir a periodos de calor intenso, incluso durante varias horas de esterilización, lo cual es perjudicial en la industria alimentaria por el alto costo de someter a los alimentos a ese tipo de tratamiento térmico.

Figura 10: Intoxicación por *Clostridium botulinum*



<http://breavenenos.blogspot.com/2011/12/botulismo-clostridium-botulinum.html>

BOTULISMO: es la enfermedad producida por el *Clostridium botulinum*, la cual empieza cuando el individuo consume un alimento que contiene la bacteria y/o su toxina.

Los brotes de intoxicación producidos por esta bacteria generalmente son por ingerir pescado, mariscos, carnes mal cocidas, embutidos, verduras crudas, frutas, enlatados mal esterilizados y conservas caseras.

SÍNTOMAS: dificultad para ver, comer y respirar, sequedad en la boca, vómito, diarrea, y posteriormente a través de circulación sanguínea la toxina llega a las terminaciones neuromusculares, impidiendo a los músculos contraerse, lo que conlleva a una parálisis y en ocasiones puede provocar la muerte por paro respiratorio.

CAPÍTULO III

CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LOS ALIMENTOS

3.1. Introducción

En la industria alimentaria es necesario realizar controles microbiológicos de los procesos de elaboración, ambientes, utensilios, equipos, materias primas y productos terminados, para poder garantizar al consumidor que el producto ofertado cumple con los requisitos microbiológicos tanto desde el punto de vista comercial como higiénico-sanitario. Con el control microbiológico también se puede detectar errores cometidos durante el proceso productivo, corregirlos rápidamente e implementar medidas preventivas.

3.2. Control de calidad requisito del Decreto 3253 (Buenas Prácticas de Manufactura)

El gobierno ecuatoriano ha puesto en vigencia el Decreto Presidencial N° 3253 de la República del Ecuador, que es el Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura para Alimentos Procesados, por lo que hoy en día, nadie puede elaborar alimentos sin apearse a las buenas prácticas de manufactura, las mismas que hacen hincapié en evitar la contaminación con agentes químicos, físicos y principalmente biológicos. De igual manera el decreto 3253 exige realizar control de calidad en procesos, materias primas, insumos y productos terminados, y dentro del control de calidad se incluye al control microbiológico; esto se puede concluir por los siguientes artículos:

“Art. 18. No se aceptarán materias primas e ingredientes que contengan parásitos, microorganismos patógenos, sustancias tóxicas (tales como, metales pesados, drogas veterinarias, pesticidas), ni materias primas en estado de descomposición o extrañas y cuya contaminación no pueda reducirse a niveles aceptables mediante la operación de tecnologías conocidas para las operaciones usuales de preparación.

Art. 19. Las materias primas e insumos deben someterse a inspección y control antes de ser utilizados en la línea de fabricación. Deben estar disponibles hojas de especificaciones que indiquen los niveles aceptables de calidad para uso en los procesos de fabricación.

Art. 60. Todas las operaciones de fabricación, procesamiento, envasado, almacenamiento y distribución de los alimentos deben estar sujetas a los controles de calidad apropiados. Los procedimientos de control deben prevenir los defectos evitables y reducir los defectos naturales o inevitables a niveles tales que no represente riesgo para la salud. Estos controles variarán dependiendo de la naturaleza del alimento y deberán rechazar todo alimento que no sea apto para el consumo humano.

Art. 61. Todas las fábricas de alimentos deben contar con un sistema de control y aseguramiento de la inocuidad, el cual debe ser esencialmente preventivo y cubrir todas las etapas de procesamiento del alimento, desde la recepción de materias primas e insumos hasta la distribución de alimentos terminados.

Art. 62. El sistema de aseguramiento de la calidad debe, como mínimo, considerar los siguientes aspectos:

1. Especificaciones sobre las materias primas y alimentos terminados. Las especificaciones definen completamente la calidad de todos los alimentos y de todas las materias primas con los cuales son elaborados y deben incluir criterios claros para su aceptación, liberación o retención y rechazo.
2. Documentación sobre la planta, equipos y procesos.
3. Manuales e instructivos, actas y regulaciones donde se describan los detalles esenciales de equipos, procesos y procedimientos requeridos para fabricar alimentos, así como el sistema almacenamiento y distribución, métodos y

procedimientos de laboratorio; es decir que estos documentos deben cubrir todos los factores que puedan afectar la inocuidad de los alimentos.

4. Los planes de muestreo, los procedimientos de laboratorio, especificaciones y métodos de ensayo deberán ser reconocidos oficialmente o normados, con el fin de garantizar o asegurar que los resultados sean confiables.

Art. 64. Todas las fábricas que procesen, elaboren o envasen alimentos, deben disponer de un laboratorio de pruebas y ensayos de control de calidad el cual puede ser propio o externo acreditado.” (Decreto Presidencial N° 3253, 2002).

3.3. Métodos de examen microbiológico

En la industria alimentaria es necesario realizar exámenes microbiológicos en los alimentos tanto para determinar su vida útil, como para garantizar su aptitud para el consumo y el cumplimiento de los requisitos del Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN).

Mediante el examen microbiológico no se mejora la calidad de un alimento, sino que se valora la carga microbiana que posee y de esta forma se puede identificar los focos de contaminación y multiplicación microbiana. Los métodos de examen microbiológico varían y dependen del alimento que va a ser analizado y requieren que se tomen muestras del alimento, se realicen análisis microbiológicos y se evalúen los resultados, comparándolos con criterios microbiológicos ya establecidos.

3.3.1. Planes de muestreo

En el examen microbiológico uno de los mayores problemas es determinar el número de muestras de un lote o de un día de trabajo que deben analizarse para asegurar que la materia prima o el producto cumple con la normativa exigida. El número, tamaño y naturaleza de las muestras que se toman para analizar influye enormemente sobre los resultados. En líquidos la muestra es verdaderamente representativa del lote muestreado, ya que los líquidos pueden mezclarse bien,

pero esto no sucede con alimentos sólidos porque un lote puede estar compuesto por unidades con amplias diferencias de calidad microbiológica.

Antes de escoger un plan de muestreo deben considerarse varios factores como: la finalidad del muestreo, la naturaleza del alimento que se va a muestrear y la naturaleza del procedimiento analítico. Cualquier plan de muestreo debe tener una base estadística y el que más comúnmente se aplica en el análisis microbiológico de alimentos es el muestreo por atributos. Existe plan de muestreo por atributos de dos y tres clases.

- **“El plan de dos clases consta de tres parámetros, n , c , m , en donde:**

n = número de unidades de muestras del lote que se va a analizar.

c = número máximo aceptable de unidades de muestras que puedan superar el valor m . El lote se rechaza si se supera este valor.

m = número máximo de bacterias relevantes por gramo. Los valores que superen este número son marginalmente aceptables o inaceptables.” (Forsythe y Hayes 2005)

Por ejemplo los requisitos microbiológicos de yogurt según la norma INEN 2395:2011 se pueden apreciar en la siguiente tabla.

Tabla 1: Requisitos microbiológicos de yogurt

Requisitos	n	m	M	c
<i>Coliformes totales, UFC/g</i>	5	10	100	2
<i>Recuento de E. coli, UFC/g</i>	5	<1	-	0
<i>Recuento de Mohos y levaduras, UFC/g</i>	5	200	500	2

Fuente: NTE INEN 2395:2011

En donde para el recuento de E. coli:

n= Numero de muestras a examinar = 5

m= Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad = <1

c= Numero de muestras permisibles con resultados mayor a entre m= 0

Esto significa que se deben analizar 5 unidades de muestra del lote, el número máximo de bacterias por gramo debe ser menor a 1 y no se aceptaran muestras que tengan valores mayores a 1 de las 5 analizadas.

- **El plan de tres clases consta de cuatro parámetros, n, c, m y M en donde:**

“n= número de unidades de muestras del lote que se va a analizar.

c= número máximo aceptable de unidades de muestras que puedan superar el valor m. El lote se rechaza si se supera este valor.

m= número máximo de bacterias relevantes por gramo. Los valores que superen este número son marginalmente aceptables o inaceptables.

M= cantidad que se utiliza para separar lo marginalmente aceptable de lo inaceptable. Los valores iguales o mayores de M en cualquier muestra son inaceptables.” (Forsythe y Hayes 2005)

Por ejemplo los requisitos microbiológicos de carne molida según la norma INEN **1346:2010** son los siguientes:

Tabla 2: Requisitos microbiológicos de carne molida

Requisitos	n	c	m	M
<i>Aerobios mesófilos ufc/g</i>	5	3	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$
<i>Escherichia coli ufc/g</i>	5	2	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
<i>Staphylococcus aureus ufc/g</i>	5	1	$1,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$
<i>Clostridium sulfito reductores ufc/g</i>	5	1	$3,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$
<i>Salmonella/ 25g</i>	5		AUSENCIA	---

Fuente: NTE INEN 1346:2010

En donde los requisitos de Aerobios mesófilos son los siguientes:

n= Numero de muestras a examinar = 5

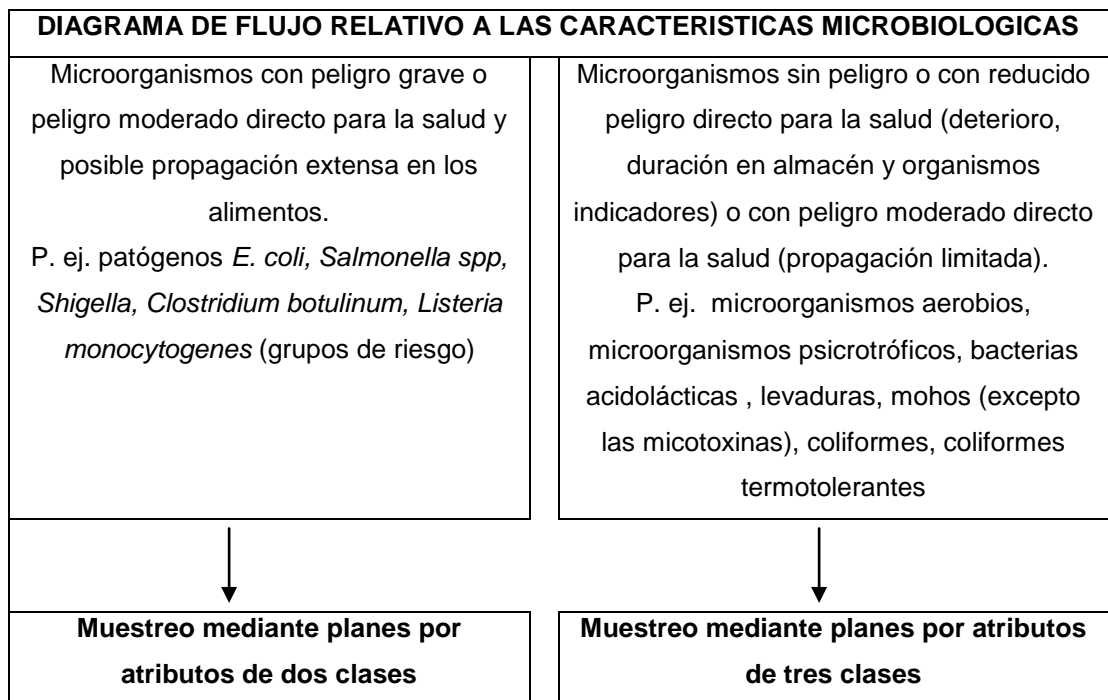
m= Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad= $1,0 \times 10^6$

M= Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad= $1,0 \times 10^7$

c= Numero de muestras permisibles con resultados entre m y M= 3

Esto significa que 3 unidades de muestra del lote de las 5 que han sido analizadas, pueden contener entre $1,0 \times 10^6$ y $1,0 \times 10^7$ Aerobios mesófilos. Si 4 unidades de las 5 analizadas tienen entre $1,0 \times 10^6$ y $1,0 \times 10^7$ Aerobios mesófilos es inaceptable o si por ejemplo solo 1 muestra de las 5 analizadas tiene más de $1,0 \times 10^7$ Aerobios mesófilos también es inaceptable.

La selección del plan de muestreo puede decidirse basándose en la gravedad del riesgo que se está examinando. En el siguiente diagrama de flujo se resume un método eficaz de selección de un plan de muestreo de acuerdo a las características microbiológicas recomendado por la Comisión del Codex Alimentarius.



3.3.2. Técnicas tradicionales de microbiología

Las técnicas tradicionales de microbiología requieren en primer lugar que la bacteria que está siendo analizada sea estimulada para que se multiplique en un medio de cultivo líquido o en la superficie de un medio solidificado con agar y forme una colonia. La formulación de un medio de cultivo dependerá tanto del microorganismo estudiado como de la finalidad general del estudio; y por ello tenemos los siguientes medios de cultivo:

Figura 11: Clases de medios de cultivo.

	<p>Finalidad general. - Proporciona los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos no exigentes</p>
	<p>Selectivo.- Deben contener compuestos que sean inhibidores para la mayoría de los microorganismos pero menos para la especie que se necesita aislar.</p>
	<p>Electivo.- Están diseñados para estimular el crecimiento más rápido de una sola especie o de un solo grupo de microorganismos sin utilizar inhibidores.</p>
	<p>Reanimación.- Permiten la recuperación de microorganismos que están dañados por un tratamiento anterior como: refrigeración, congelación, tratamiento térmico, irradiación, etc.</p>
	<p>Diagnóstico.- Contienen reactivos para dar una respuesta visible a una determinada reacción, permitiendo identificar especies o grupos de especies.</p>

<http://cabronio.blogspot.com/2008/08/medios-de-cultivo-y-pruebas-bioquimicas.html>

Los medios de cultivo pueden venir en dos presentaciones: granulados y deshidratados en polvo. Los granulados ofrecen ciertas ventajas en comparación con los en polvo como por ejemplo: escasa producción de polvo durante la manipulación con lo cual se reduce la respiración de sustancias tóxicas o alergénicas; facilita el pesaje ya que las partículas no se adhieren a las paredes de los recipientes; no se forman grumos; mejor conservación; escaso contenido de humedad y una distribución uniforme de los componentes de la fórmula. Tanto los medios en polvo como los granulados deben conservarse en un lugar seco, protegidos de la luz, a una temperatura entre 15°C hasta 30°C y en recipientes bien cerrados.

Foto 9: Medios de cultivo.



Para la preparación de los medios de cultivo se utiliza agua limpia, destilada y cuyo pH sea lo más cercano a la neutralidad (pH=7). Los recipientes destinados a la preparación deben ser limpiados adecuadamente con agua destilada y estos deben ser lo suficientemente grandes como para permitir la agitación. Luego de pesar la cantidad de medio que se vaya a preparar se debe agregar la mitad de la cantidad de agua necesaria y se agita hasta conseguir una mezcla homogénea y posteriormente se agrega la otra mitad de agua restante. Algunos medios de cultivo requieren someterse a un tratamiento térmico ya sea de calentamiento o esterilización antes de ser utilizados.

En cuanto a las temperaturas de incubación estas dependen del microorganismo que se está aislando. Las temperaturas que comúnmente se utilizan son 45°C para los termófilos, de 35°C a 37°C para la mesófilas y 5°C para bacterias psicrófilas.

Los métodos tradicionales requieren de tiempo y mano de obra para la preparación de los medios de cultivos, además se necesita de varios días de incubación para que los microorganismos puedan detectarse; por lo que se han desarrollado varios métodos rápidos para evitar estas técnicas laboriosas y que consumen mucho tiempo.

3.3.3. Técnicas rápidas de microbiología

Las técnicas rápidas de microbiología empezaron a ser utilizadas por microbiólogos clínicos en la década de los 60, su aplicación al análisis de los alimentos comenzó unos 10 años después. Los métodos rápidos de análisis microbiológicos deben cumplir con ciertos requisitos como por ejemplo: exactitud en la obtención de resultados, sencillez de manejo, facilidad de preparación de los reactivos, rapidez en los análisis y la obtención de resultados, mínimo espacio requerido, etc. Las principales técnicas rápidas para la detección de organismos son:

- **Técnicas rápidas para el recuento de células viables:** En el control de calidad de los alimentos es primordial realizar un recuento de células viables tanto de materias primas, productos terminados, superficies y de los ambientes. Para este análisis se utiliza tradicionalmente el Método estándar de recuento en placa, el cual es muy trabajoso, requiere de una gran cantidad de materiales, medios de cultivo y diluyentes; por lo que en los últimos años los avances tecnológicos han desarrollado nuevos métodos alternativos, precisos y rápidos para el recuento de células viables entre los principales tenemos:

Figura 12: Técnicas rápidas para el recuento de células viables.

Sistemas de siembra en espiral



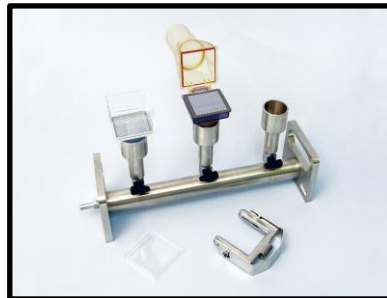
<http://www.directindustry.es/prod/iu-l-instruments/sembradores-automaticos-54975-361089.html>

Redigel



http://multimedia.3m.com/mws/media/webserver?mwsId=66666UuZjcFSLXTt4xTtlxT_EVuQEcuZgVs6EVs6E666666--&fn=70-2009-3233-6.pdf

Isogrid



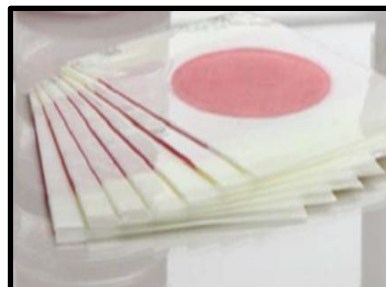
<http://www.nirco.com/web/pc-3-39-67-298-/Neo-Grid-/Iso-Grid>

Neogrid



<http://www.nirco.com/web/pc-3-39-67-298-/Neo-Grid-/Iso-Grid>

Petrifilm



<http://www.sagisa.com/analytical/petrifilm.php>

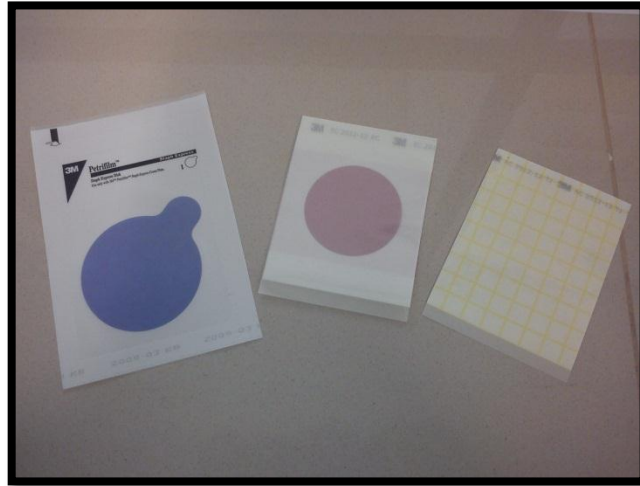
Automatización del método del Numero Más Probable



<http://www.serco.com.mx/productos/inocuidad/pruebas-microbiologicas/18-simplate-.html>

El método de Petrifilm es el más empleado, utiliza medios de cultivo deshidratados sobre películas plásticas pequeñas y delgadas. El medio deshidratado contiene compuestos selectivos, un componente que permite la gelificación en frío y colorantes para la tinción de las colonias desarrolladas, facilitando así su identificación y recuento.

Foto 10: Método petrifilm.



La principal ventaja del método Petrifilm es que no requiere preparación previa de los medios de cultivo, lo que reduce costos y tiempo de análisis. Además el método de Petrifilm es reconocido y aceptado nacional e internacionalmente por instituciones y organizaciones como: Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” (INHMT), La AOAC Internacional, El Manual de Análisis Bacteriológico de la FDA de los Estados Unidos (BAM) y La Organización Nacional Francesa de Estandarización (AFNOR).

- **Sistemas miniaturizados y kits de diagnóstico:** Los sistemas miniaturizados permiten reducir el volumen de reactivos y de medio a emplear en los análisis. Entre los sistemas miniaturizados de identificación microbiana disponibles en la actualidad se destacan los siguientes:

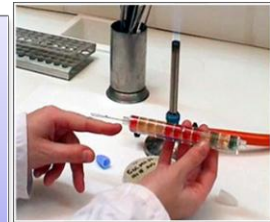
Figura 13: Sistemas miniaturizados y kits de diagnóstico.



Tarjetas desechables para la identificación sencilla de colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas rápidas.

<http://www.rapidmicrobiology.com/news/603h121.php>

Tubos de plástico con compartimentos que contienen agar con distintos sustratos y con una aguja en su interior que posibilita la inoculación del tubo de forma rápida y sencilla a partir de una única colonia.



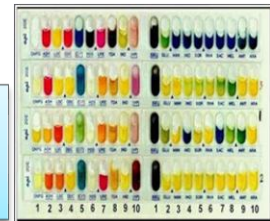
http://virus.usal.es/Web/demo_mr/Enterotube/Enterotubell.htm



Sistema que, basándose en cambios de color de los sustratos o en la producción de gas de los cultivos inoculados puede identificar E. coli en 2-4 horas.

<http://www.diagnosticinternacional.com/microaut.html>

Galerías que permiten la identificación de más de 800 especies de bacterias y levaduras.



<http://bacteriasactuaciencia.blogspot.com/2011/03/bacterias-de-los-asistentes-al-taller.html>

- **Métodos de medida de la biomasa microbiana:** este método está basado en detectar señales relacionadas con el crecimiento microbiano como niveles de ATP, enzimas específicas, pH, etc. Entre estos métodos se pueden destacar: la Bioluminiscencia o medida del ATP, Impedimetría y la Turbidimetría.

Foto 11: Equipo para medir Biomasa.



Fuente: <http://www.bcaplicaciones.com/producto/luminometropromilitei.html>

3.3.4. Otras técnicas actuales

- **Métodos inmunológicos:** Son procedimientos analíticos basados en la interacción entre un antígeno y su anticuerpo, muy utilizados en el control microbiológico de los alimentos por su alta sensibilidad, rapidez y especificidad. Existen varias técnicas inmunológicas entre las que se puede destacar: La Inmunoenzimática, Inmunofluorescencia, Aglutinación, Inmunodifusión, Inmunolectroforesis, Radioinmunoensayo, etc.; pero de todas ellas la técnica inmunoenzimática de ELISA es la más utilizada en el análisis microbiológico de los alimentos.

Figura 14: Equipo para Microelisa

<p>Reactivos</p>		<p>Placa</p>	
	<p>http://www.godowell.com/Biochemical-series/Mice-25-hydroxy-vitamin-D3-ELISA-Kit/</p>		<p>http://www.biomerieux.com.ar/servlet/srt/bio/argentina/dynPage?doc=ARG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_57</p>
<p>Lavador de placas</p>		<p>Lector de placas</p>	
	<p>http://www.plm-deaci.com/src/Productos/43_lavador.html</p>		<p>http://www.dcnls.com/Productos/Laboratorio/elx-800-lector-elisa-microplacas.htm</p>

- **Metodología del ADN/ARN:** este método se basa en la detección de características celulares estables contenidas en los ácidos nucleicos. La técnica genética más utilizada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que amplifica el ADN de los microorganismos para permitir su detección.

Foto 12: Equipo PCR.



Fuente: <http://www.landcareresearch.co.nz/research/biocons/genetics/facilities.asp>

Las ventajas de las técnicas rápidas de análisis son: el ahorro de material y de horas de trabajo, ocupan menos espacio, útiles cuando se analizan un gran número de muestras, permite liberar lotes de producto rápidamente, la toma de decisiones en poco tiempo y la aplicación temprana de medidas correctoras. Algunos de ellos, por su sencillez, pueden incluso ser realizados por personal no especializado. Mientras que las que se basan en biología molecular tienen la desventaja de su alto costo por lo que están al alcance de instituciones dedicadas a la investigación.

CAPÍTULO IV

GUÍA DE MUESTREO Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO PARA LÁCTEOS Y CÁRNICOS

4.1. Introducción

La guía está dirigida al personal relacionado con el aseguramiento de la calidad e inocuidad de alimentos, porque proporciona información básica a cerca de los procedimientos de muestreo y técnicas tradicionales y rápidas de análisis microbiológico, tanto de materias primas como productos terminados.

Para llevar a cabo un control microbiológico es necesario seguir estos pasos:

- Conocer cuáles son los requisitos microbiológicos del producto que se va analizar,
- Realizar el muestreo,
- Preparar la muestra para el ensayo cuando sea necesario,
- Determinar que técnica de análisis es la más apropiada en función de los microorganismos que se requieren determinar,
- Llevarla a cabo e
- Interpretar los resultados obtenidos.

4.2. Requisitos microbiológicos de leche y productos lácteos

4.2.1. Leche cruda

Los requisitos microbiológicos y el tiempo de reducción del azul de metileno (TRAM) para la clasificación de la leche cruda de vaca, especificados en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 9:2008 se pueden apreciar en la siguiente tabla.

Tabla 3: Requisitos microbiológicos de leche cruda

Categoría	Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM) NTE INEN 18	Contenido de microorganismos aerobios mesófilos REP UFC/cm³ NTE INEN 1529-5
A (buena)	Más de 5 horas *	Hasta 5×10^5
B (regular)	De 2 a 5 horas	Desde 5×10^5 hasta $1,5 \times 10^6$
C (mala) ¹⁾	De 30 minutos a 2 horas	Desde $1,5 \times 10^6$ hasta 5×10^6
D (muy mala) ¹⁾	Menos de 30 minutos	Más de 5×10^6
* Puede deberse a la presencia de conservantes por lo que se recomienda su identificación según la NTE INEN 1500.		
¹⁾ La leche de la categoría C y D no se acepta para ser procesada.		

Fuente: NTE INEN 9:2008

4.2.2. Leche pasteurizada

La Norma Técnica Ecuatoriana INEN 10:2009 exige que la leche pasteurizada esté libre de microorganismos patógenos y los requisitos microbiológicos son los siguientes:

Tabla 4: Requisitos microbiológicos de leche pasteurizada

REQUISITOS	LÍMITE MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO
REP UFC/cm ³ Recuento total de microorganismos <i>Aerobios mesófilos</i>	$3,0 \times 10^4$	NTE INEN 1529-5
<i>Coliformes totales</i> NMP/cm ³	$3,6 \times 10^0$	NTE INEN 1529-6
<i>Coliformes totales</i> REP UFC/cm ³	5×10^0	NTE INEN 1529-7
<i>Coliformes fecales</i> y <i>Escherichia coli</i> NMP/cm ³	$<3,0 \times 10^0$ *	NTE INEN 1529-8
* $<3,0 \times 10^0$, significa que no existirá ningún tubo positivo en la técnica NMP con tres tubos.		

Fuente: NTE INEN 10:2009

4.2.3. Queso fresco

Según la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1528:87 el queso fresco no debe contener microorganismos patógenos esto se pueden observar en la siguiente tabla.

Tabla 5: Requisitos microbiológicos de queso fresco

Requisitos	Unidad	Máximo	Método de Ensayo
<i>Escherichia coli</i>	Colonias/g	100	NTE INEN 1529
<i>Staphylococcus Aureus</i>	Colonias/g	100	NTE INEN 1529
Mohos y levaduras	Colonias/g	50.000	NTE INEN 1529
Salmonella	Colonias/25g	0	NTE INEN 1529

Fuente: NTE INEN 1528:87

4.2.4. Yogur

La Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2395:2011 especifica los requisitos microbiológicos que debe cumplir las leches fermentadas, es decir para yogur, kumis, kéfir y leches fermentadas con ingredientes; y son los siguientes:

Tabla 6: Requisitos microbiológicos de yogur

Requisitos	n	m	M	c	Método de Ensayo
<i>Coliformes totales</i> , UFC/g	5	10	100	2	NTE INEN 1529-7
Recuento de <i>E. coli</i> , UFC/g	5	<1	-	0	NTE INEN 1529-8
Recuento de Mohos y levaduras, UFC/g	5	200	500	2	NTE INEN 1529-10

Fuente: NTE INEN 2395:2011

4.2.5. Manjar

Los requisitos microbiológicos que debe cumplir el manjar o dulce de leche según la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 700:2011 se puede observar en la siguiente tabla.

Tabla 7: Requisitos microbiológicos de manjar

Requisitos	n	c	m	M	Método de Ensayo
Recuento de Mohos y levaduras, UFC/g	5	2	10	10 ²	NTE INEN 1529-10

Fuente: NTE INEN 700:2011

4.3. Requisitos microbiológicos de carne y productos cárnicos

4.3.1. Carne molida

La Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1346:2010 especifica los requisitos microbiológicos que debe cumplir la carne molida, estos se pueden observar en la siguiente tabla.

Tabla 8: Requisitos microbiológicos de carne molida

Requisitos	n	c	m	M	Método de Ensayo
<i>Aerobios mesófilos</i> ufc/g	5	3	1,0 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁷	NTE INEN 1529-5
<i>Escherichia coli</i> ufc/g	5	2	1,0 x 10 ²	1,0 x 10 ³	NTE INEN 1529-8
<i>Staphylococcus aureus</i> ufc/g	5	1	1,0 x 10 ²	5,0 x 10 ²	NTE INEN 1529-14
<i>Clostridium sulfito reductores</i> ufc/g	5	1	3,0 x 10 ¹	1,0 x 10 ²	NTE INEN 1529-18
Salmonella/ 25g	5		AUSENCIA	---	NTE INEN 1529-15

Fuente: NTE INEN 1346:2010

4.3.2. Productos cárnicos crudos

Los requisitos microbiológicos que deben cumplir los productos cárnicos crudos según la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1338:2010 son los siguientes:

Tabla 9: Requisitos microbiológicos de productos cárnicos crudos

Requisitos	n	c	m	M	Método de Ensayo
<i>Aerobios mesófilos</i> ufc/g *	5	3	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	NTE INEN 1529-5
<i>Escherichia coli</i> ufc/g *	5	2	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	NTE INEN 1529-8
<i>Staphylococcus aureus</i> ufc/g *	5	2	$1,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^4$	NTE INEN 1529-14
Salmonella/ 25g **	5	0	AUSENCIA	---	NTE INEN 1529-15
<i>E. coli</i> O157 H7 **	5	0	AUSENCIA	---	ISO 16654
* Requisitos para determinar tiempo de vida útil					
** Requisitos para determinar inocuidad del producto					

Fuente: NTE INEN 1338:2010

4.3.3. Productos cárnicos curados- madurados

Los productos cárnicos curados- madurados deben cumplir los requisitos microbiológicos especificados en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1338:2010 que son los siguientes:

Tabla 10: Requisitos microbiológicos de productos cárnicos curados- madurados

Requisitos	n	c	m	M	Método de Ensayo
<i>Staphylococcus Aureus</i> ufc/g *	5	1	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	NTE INEN 1529-14
<i>Clostridium perfringens</i> ufc/g *	5	1	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	NTE INEN 1529-18
Salmonella/ 25g**	10	0	AUSENCIA	---	NTE INEN 1529-15
*Requisitos para determinar tiempo de vida útil					
** Requisitos para determinar inocuidad del producto					

Fuente: NTE INEN 1338:2010

4.3.4.Productos cárnicos cocidos

Los productos cárnicos cocidos deben cumplir con los requisitos microbiológicos de la tabla de acuerdo a la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1338:2010.

Tabla 11: Requisitos microbiológicos de productos cárnicos cocidos

Requisitos	n	c	M	M	Método de Ensayo
<i>Aerobios mesófilos</i> ufc/g *	5	1	$5,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^7$	NTE INEN 1529-5
<i>Escherichia coli</i> ufc/g *	5	0	<3	--	NTE INEN 1529-8
<i>Staphylococcus aureus</i> ufc/g *	5	1	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	NTE INEN 1529-14
Salmonella/ 25g **	10	0	Ausencia	---	NTE INEN 1529-15
* Requisitos para determinar tiempo de vida útil					
** Requisitos para determinar inocuidad del producto					

Fuente: NTE INEN 1338:2010

4.3.5.Productos cárnicos precocidos congelados- Requisitos microbiológicos según norma INEN 1338:2010

La Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1338:2010 especifica los requisitos microbiológicos que debe cumplir los productos cárnicos precocidos congelados, estos se pueden observar en la tabla.

Tabla12: Requisitos microbiológicos de productos cárnicos precocidos congelados

Requisitos	n	c	m	M	Método de Ensayo
<i>Aerobios mesófilos</i> ufc/g *	5	3	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	NTE INEN 1529-5
<i>Escherichia coli</i> ufc/g *	5	2	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	NTE INEN 1529-8
<i>Staphylococcus aureus</i> ufc/g *	5	2	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^4$	NTE INEN 1529-14
Salmonella/ 25g **	5	0	Ausencia	---	NTE INEN 1529-15
<i>E. coli</i> O157H7**	5	0	Ausencia	---	ISO 16654
* Requisitos para determinar tiempo de vida útil ** Requisitos para determinar inocuidad del producto					

Fuente: NTE INEN 1338:2010

4.4. Muestreo

4.4.1. Generalidades

El muestreo debe ser realizado por personal autorizado que tenga la formación apropiada para llevarlo a cabo, el mismo que deberá tomar las medidas adecuadas para evitar la contaminación durante la toma, envío y preparación de las muestras; como por ejemplo:

Figura 15: Recomendaciones para el personal que realiza muestreo



En el muestreo de lácteos y cárnicos los empaques o envases que contengan las unidades de muestreo deberán sellarse herméticamente y de la muestra obtenida, una parte debe ser destinada al fabricante o vendedor, otra al laboratorio y una tercera debe reservarse para enviarla a la entidad competente en caso de inconformidad o demanda.

Tanto la norma de muestreo de carne y productos cárnicos (NTE INEN 776) como la de leche y productos lácteos (NTE INEN 4) recomiendan que en cada muestra se coloque una tarjeta que incluya un número de identificación y fecha de muestreo; y que en la muestra enviada al laboratorio se incluya un acta de muestreo, la cual debe contener los siguientes datos:

ACTA DE MUESTREO	
<i>Número de la norma INEN de referencia (marcar con una X)</i>	Leche y productos lácteos INEN 4 () Carne y productos cárnicos INEN 776 ()
<i>Realización del muestreo</i>	
<i>Lugar:</i> _____	<i>Fecha:</i> _____
	<i>Hora:</i> _____
<i>Número de identificación de la muestra:</i>	
<i>Nombre y marca comercial del producto muestreado:</i>	
<i>Lugar de procedencia de la muestra:</i>	
<i>Peso o volumen de la muestra:</i>	
<i>Forma y temperatura de almacenamiento de la muestra:</i>	
<i>Medio de transporte para el envío de la muestra:</i>	
<i>Lugar de destino del producto muestreado:</i>	
<i>Numero de muestras o unidades de muestreo obtenidas del lote:</i>	
<i>Identificación del lote:</i>	
<i>Peso o volumen total del lote:</i>	
<i>Observaciones que se consideren necesarias</i>	
<i>Nombres, firmas y direcciones de las partes interesadas</i>	

Las normas de muestreo antes mencionadas (INEN 4 e INEN 776), especifican también ciertos requisitos que deben cumplir los envases destinados a contener las muestras, si se trata de muestras líquidas, sólidas o semisólidas los cuales se presentan en la siguiente figura.

Figura 16: Requisitos de los envases para muestreo



El instrumental usado para la toma de muestra, mezcla del producto, extracción de la muestra y envío debe ser de vidrio, acero inoxidable o aluminio, estar esterilizado y completamente seco antes de su uso. Podrá esterilizarse mediante uno de los métodos descritos en las normas de muestreo (INEN 4 e INEN 776), que se presentan en las siguientes ilustraciones:

Figura 17: Métodos de esterilización



Esterilización seca (en una estufa):
Exposición a aire caliente a 170°C por mínimo 2 horas.



Esterilización húmeda (en autoclave) :
Someter a vapor a 121°C por un tiempo no menor a 20 minutos.

El instrumental esterilizado mediante uno de estos dos procedimientos podrá guardarse siempre y cuando se mantengan las condiciones estériles. Pero si ninguno de los métodos anteriores es aplicable y si el equipo debe utilizarse inmediatamente se puede adoptar uno de los siguientes procedimientos:

Figura 18: Métodos alternativos de esterilización



Inmersión en agua a 100°C durante un minuto.



Exposición a una llama de gas (propano, butano), es decir que todas las superficies del material deben entrar en contacto con la llama antes del uso.



Inmersión a alcohol etílico al 96% y luego exposición a llama hasta eliminar el alcohol, inmediatamente antes del uso.

La selección del procedimiento de esterilización dependerá del tamaño, forma, calidad y material del instrumental así como también de las condiciones del muestreo.

4.4.2. Muestreo de lácteos

En lácteos puede usarse como unidad de muestreo el contenido de un envase pequeño el cual no deberá abrirse y peor aún alterarse.

“Para productos empacados o envasados en recipientes pequeños, cada muestra estará conformada por el número de unidades de muestreo indicadas en la siguiente tabla, que deben ser tomadas al azar”. (NTE INEN 4)

Foto 13: Envases pequeños



Tabla 13: Muestreo para unidades pequeñas

Tamaño del lote	Unidades para muestreo
Menos de 100	1
101 – 1000	2
1001 - 10000	3
Más de 10000	*
* 4, más 1 por cada 2500 unidades adicionales o fracción de tal cantidad.	

Fuente: NTE INEN 4

Foto 14: Envase voluminoso



“En el caso de productos empacados o envasados en recipientes grandes, cada muestra estará conformada por el número de recipientes indicados en la tabla, tomados al azar. De los cuales se extraerá la unidad de muestreo requerida para realizar el análisis, ya sea de volumen o masa”. (NTE INEN 4)

Tabla 14: Muestreo para unidades voluminosas

Tamaño del lote	Unidades para muestreo
1	1
2 – 5	2
6 – 60	3
61 – 80	4
81 – 100	5
Más de 100	*
* 4, más 1 por cada 2500 unidades adicionales o fracción de tal cantidad.	

Fuente: NTE INEN 4

En lácteos el procedimiento de muestreo varía en función de la naturaleza del producto a muestrear, en las siguientes figuras se presentan los procedimientos para lácteos líquidos y sólidos.

Figura 19: Procedimiento de muestreo para lácteos líquidos

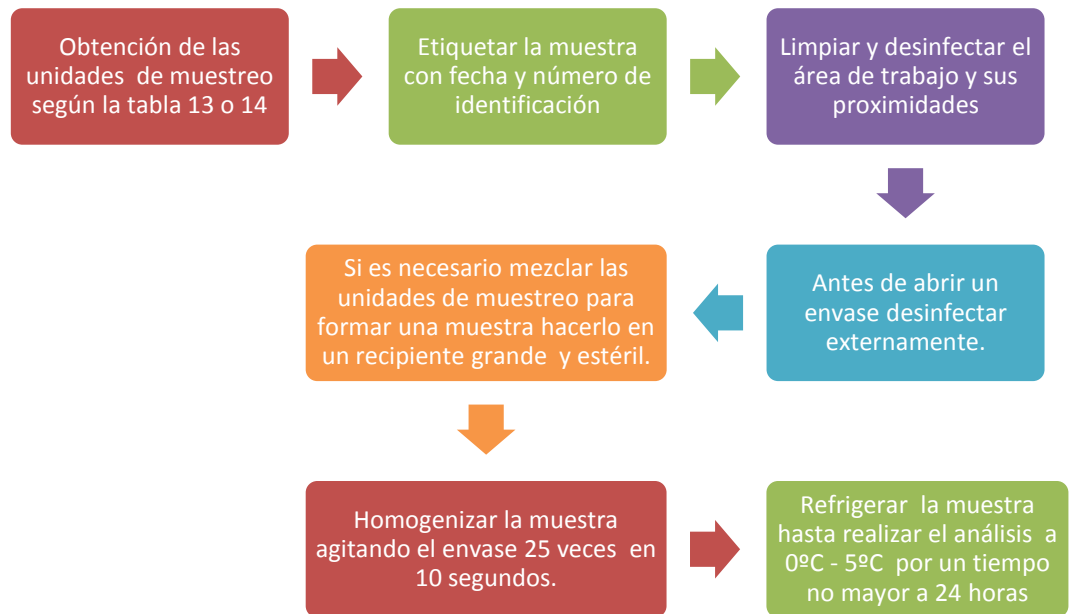
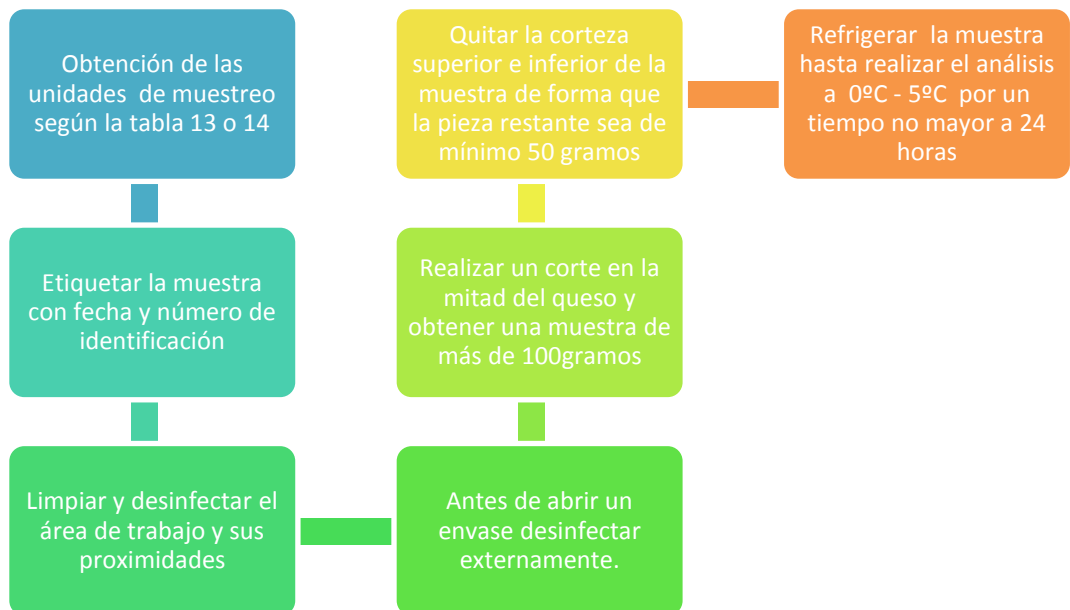


Figura 20: Procedimiento de muestreo para lácteos sólidos



4.4.3. Muestreo de cárnicos

Se realiza por triplicado del lote de producción; es decir únicamente se toman tres muestras de todo el lote. A nivel comercial la muestra será de máximo 500gramos. Las muestras tomadas al azar deben ser selladas herméticamente, etiquetadas y enviadas inmediatamente a ser analizadas. Los productos refrigerados deben transportarse a una temperatura entre 0 y 2 °C y los congelados a -15°C y estas condiciones deben ser mantenidas por máximo 24horas.

A continuación se presentan los procedimientos de muestreo para carne, productos cárnicos congelados y embutidos.

Figura 21: Procedimiento de muestreo para cárnicos congelados

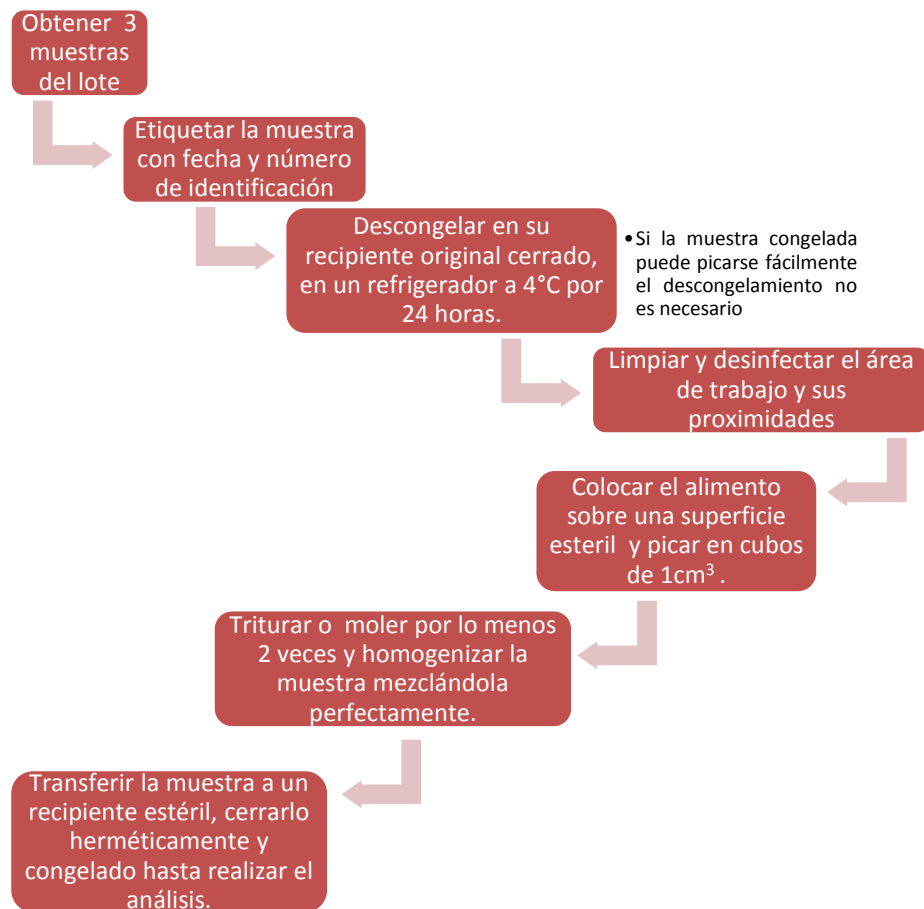


Figura 22: Procedimiento de muestreo para carne

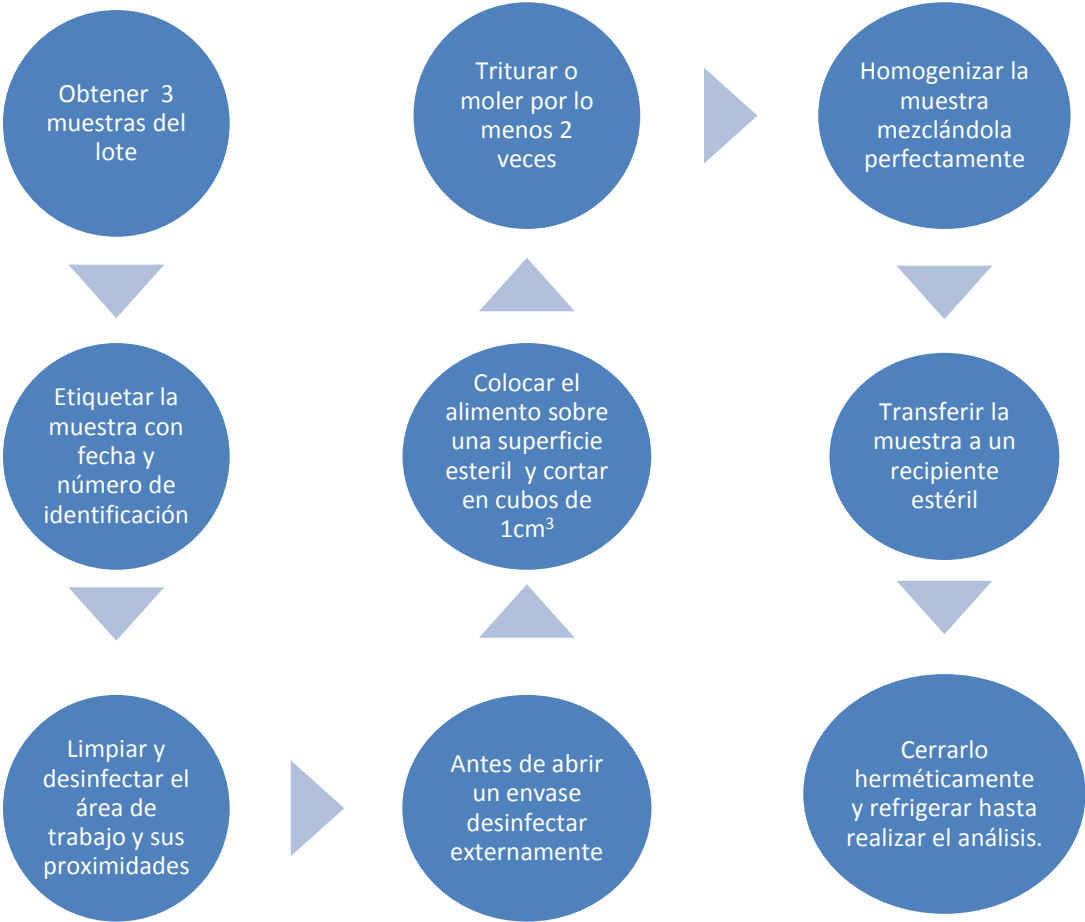
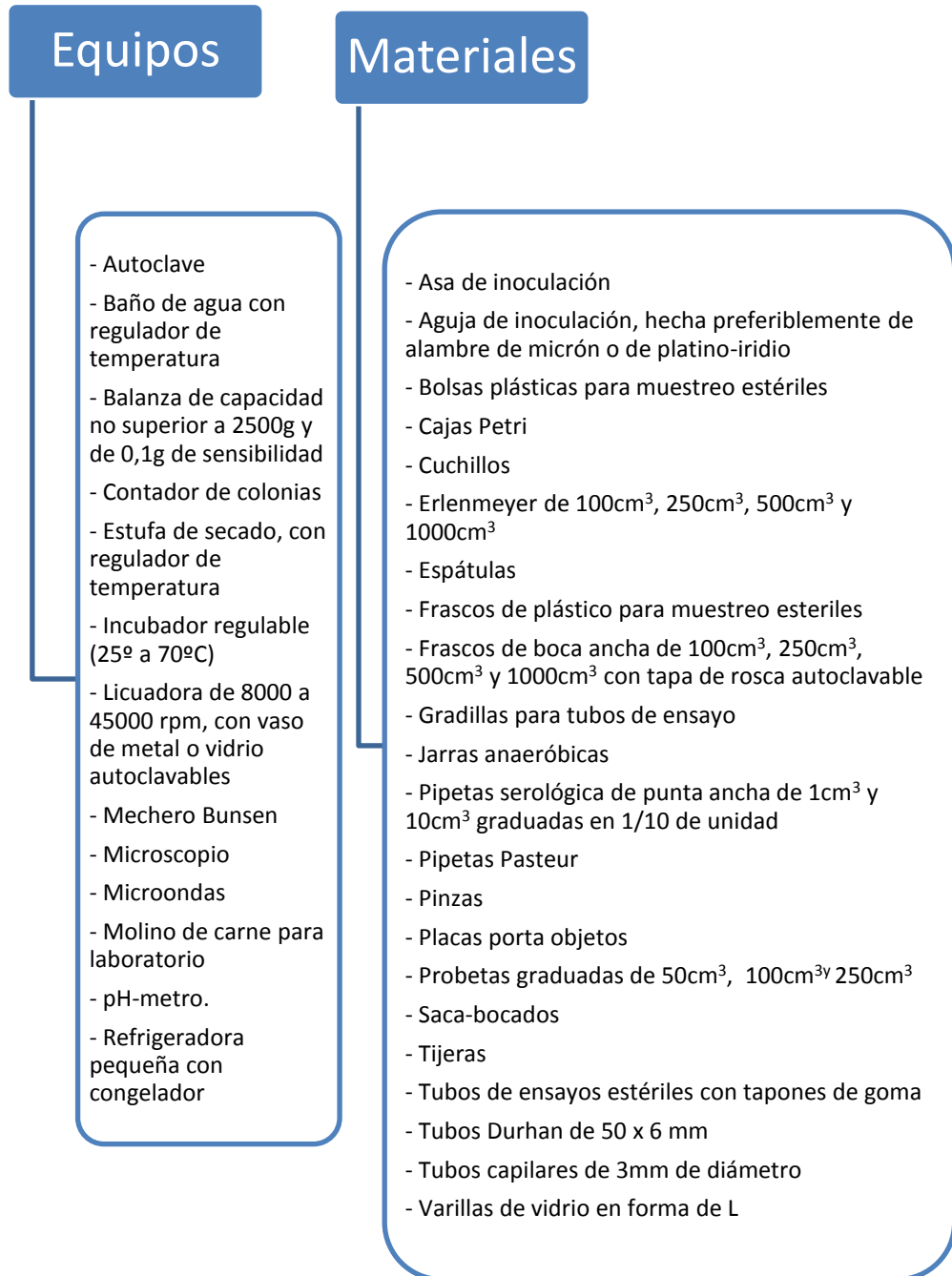


Figura 23: Procedimiento de muestreo para embutidos



4.5. Equipos y materiales necesarios para realizar las técnicas de análisis.

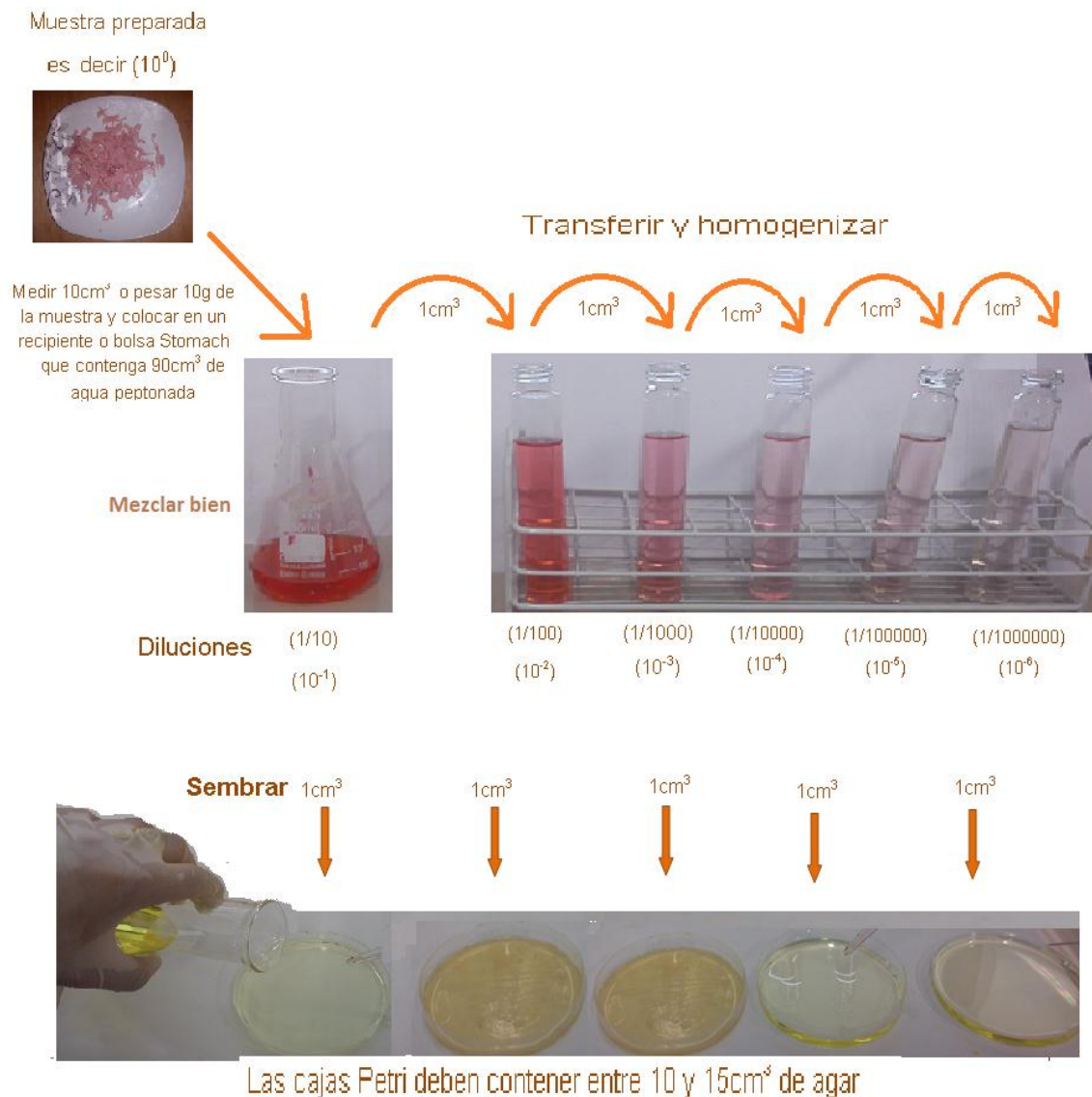
Figura 24: Equipos y Materiales



4.6. Preparación de la muestra para el ensayo

Luego de preparar la muestra siguiendo los procedimientos descritos anteriormente en los puntos 4.4.2 y 4.4.3, cuando sea necesario se procede a prepararla para el ensayo diluyéndola en condiciones asépticas, con agua estéril en proporciones de 1/10; 1/100; 1/1000 y otras que se consideren convenientes. Cada proporción debe conseguirse mediante diluciones sucesivas de la siguiente forma:

Figura 25: Preparación de la muestra para el ensayo



4.7. Técnicas microbiológicas para el análisis de lácteos y cárnicos.

4.7.1. Técnicas microbiológicas tradicionales

a) Determinación de *Aerobios mesófilos* según norma INEN 18

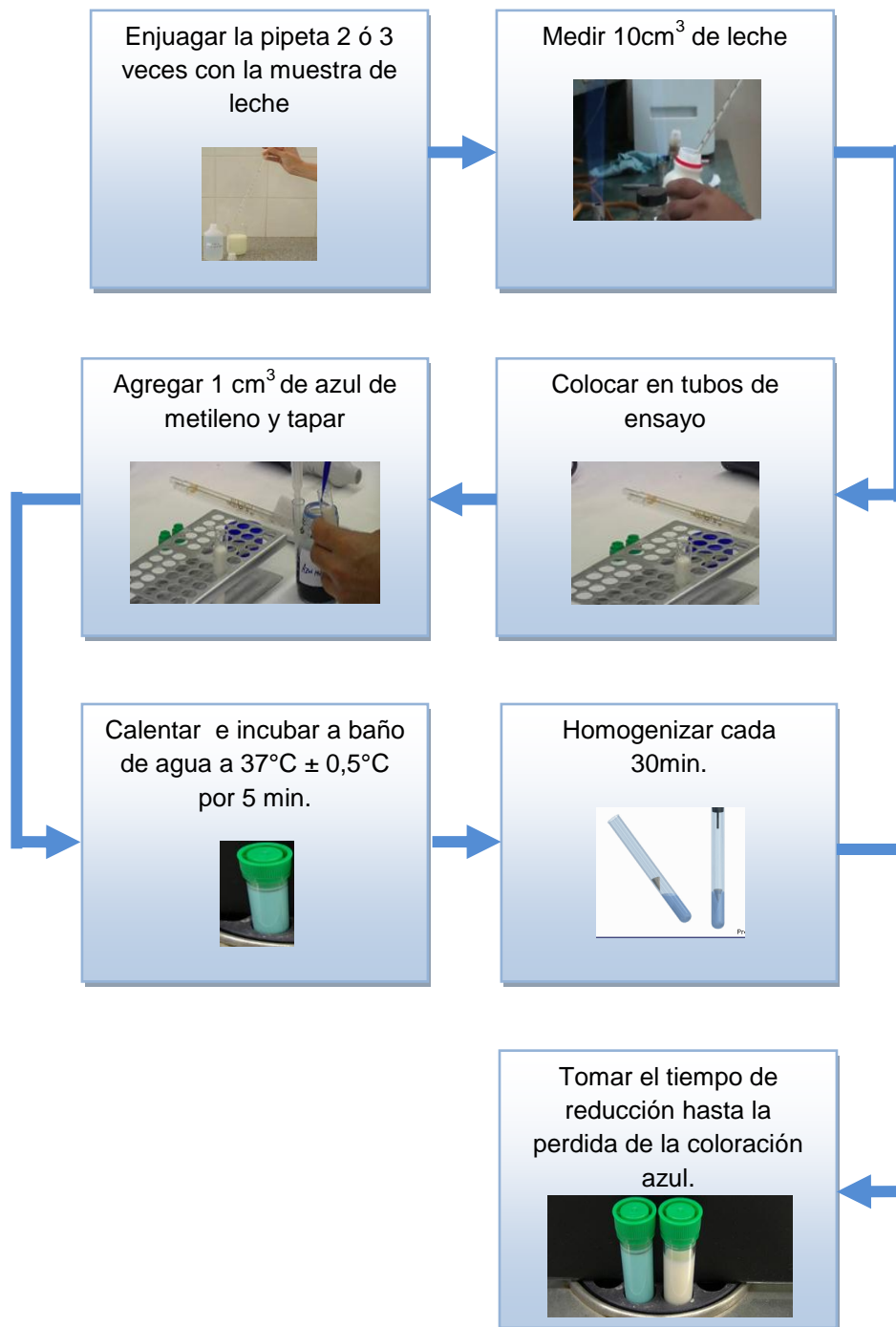
Esta técnica se utiliza en Leche cruda y se basa en medir el tiempo que tarda la leche para decolorar el azul de metileno, mediante reducción. El tiempo de reducción es inversamente proporcional al número de microorganismos contenidos en la leche al empezar la incubación.

REACTIVOS:

- Azul de metileno.

PROCEDIMIENTO: La determinación debe realizarse por duplicado para cada muestra

Figura 26: Procedimiento para la determinación de Aerobio mesófilos (Tiempo de Reducción del Azul de Metileno)



CÁLCULOS: “Se debe reportar los resultados obteniendo una media aritmética, expresada en horas y decimas de horas. Comparar el resultado obtenido con la tabla de requisitos microbiológicos de leche cruda.” (NTE INEN 0018:73)

Ejemplo: Al realizar la determinación del tiempo de reducción del azul de metileno de una muestra de leche fresca se obtiene los siguientes resultados:

- a) 4 horas
- b) 4 horas y 20 minutos

Primero convertir los minutos a horas, multiplicando por 1 y dividiendo para 60

$$\frac{20 \text{ minutos} \times 1 \text{ hora}}{60 \text{ minutos}} = 0,3333 \text{ horas}$$

Es decir el tiempo b) es 4,33 horas

$$\text{Media aritmética} = \frac{4 \text{ horas} + 4,33 \text{ horas}}{2} = 4,17 \text{ horas}$$

Comparando este resultado con los valores de la tabla de requisitos microbiológicos se trata de una leche tipo B (regular) cuyo contenido de microorganismos aerobios mesófilos está entre 5×10^5 hasta $1,5 \times 10^6$ UFC/cm³.

b) Determinación de *Aerobios mesófilos* según norma INEN 1529-5

Mediante ésta técnica se puede determinar *Aerobios mesófilos* en cualquier alimento destinado al consumo humano o animal. En esta guía se aplica a:

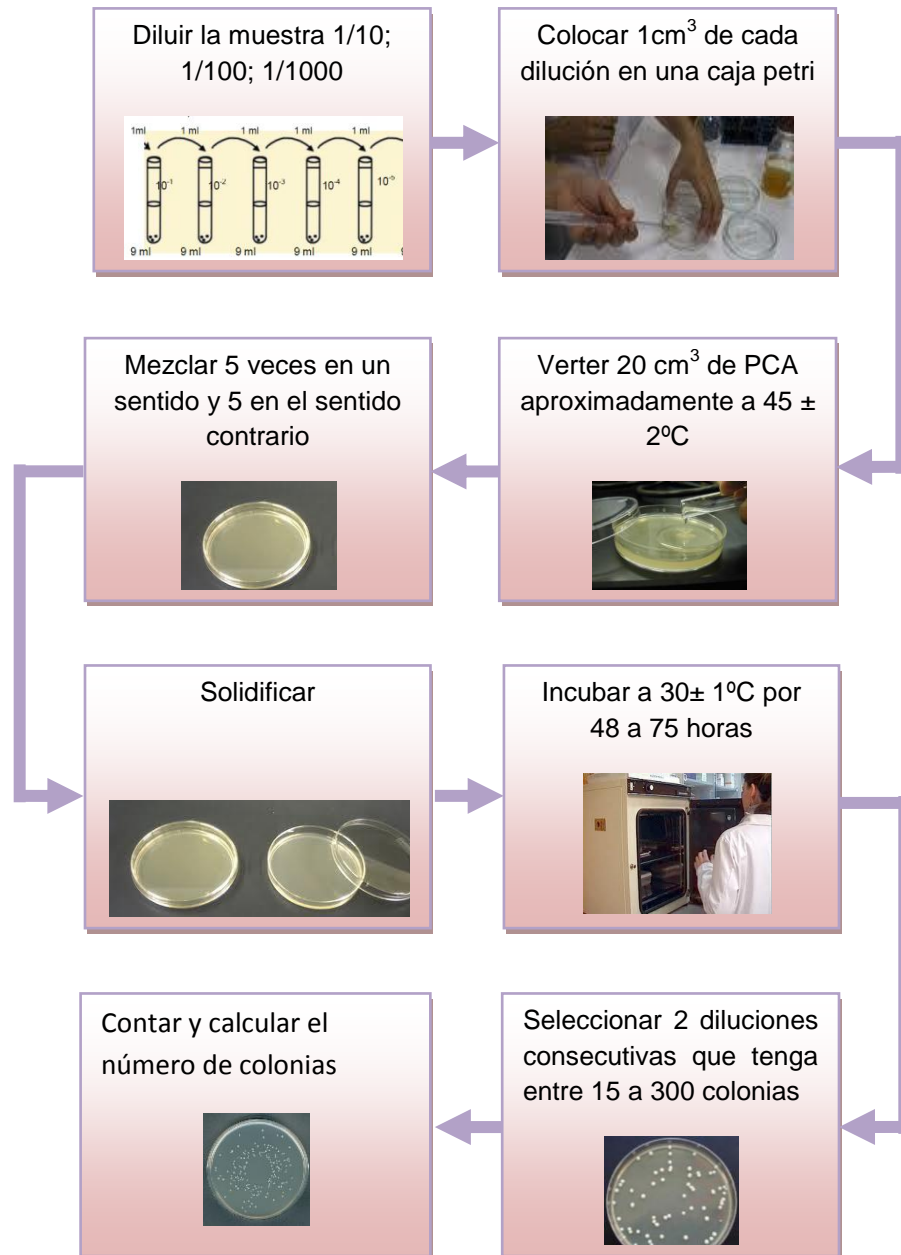
Leche cruda,
Leche pasteurizada,
Carne molida,
Productos cárnicos crudos,
Productos cárnicos cocidos y
Productos cárnicos precocidos congelados

REACTIVOS y MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar para recuento en placa (PCA)
- Agua peptona al 0,1%

PROCEDIMIENTO: La determinación debe realizarse por duplicado para cada muestra

Figura 27: Procedimiento para la determinación de Aerobios mesófilos



CÁLCULOS: “Contar el número de colonias en cada caja Petri y aplicar la siguiente formula:

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Dónde:

$\sum c$ = suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas.

V= volumen inoculado en cada caja Petri.

n_1 = número de placas de la primera dilución seleccionada.

n_2 = número de placas de la segunda dilución seleccionada.

d = factores de dilución de la primera seleccionada

(d= 1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir);

(d=0,1 cuando la dilución ha sido 1/10);

(d=0,01 cuando la dilución ha sido 1/100); y

(d=0,001 cuando la dilución ha sido 1/1000).” (NTE INEN 1529-5)

Redondear los resultados obtenidos a dos cifras significativas.

Ejemplo: Se requiere determinar el número de microorganismos aerobios mesófilos en una muestra de leche. Se ha realizado las siguientes diluciones de la muestra: 1/10, 1/100 y 1/1000 y cada dilución se ha sembrado por duplicado (siembra en dos placas).

Se ha sembrado 1mL (=1cm³) en cada placa.

Del conteo de colonias formadas se obtiene los siguientes resultados:

DILUCIÓN	CONTEO PLACA 1	CONTEO PLACA 2
1/10 (es decir 10 ⁻¹)	2120 colonias	1680 colonias
1/100 (es decir 10 ⁻²)	225 colonias	178 colonias
1/1000 (es decir 10 ⁻³)	25 colonias	15 colonias

Seleccionar dos diluciones (para este ejemplo se han seleccionado las diluciones 1/100 y 1/1000) para realizar el cálculo. Reemplazar los datos en la fórmula:

$$N = \frac{225 + 178 + 25 + 15}{1 \times (2 + 0,1 \times 2) \times 0,01}$$

$$N = \frac{443}{1 \times (2 + 0,2) \times 0,01}$$

$$N = \frac{443}{1 \times (2,2) \times 0,01}$$

$$N = \frac{443}{0,022}$$

$$N = 20136 \text{ Microorganismos por gramo o cm}^3$$

Redondeando $N = 20.000 = 2,0 \times 10^4$ microorganismos por gramo o cm^3

c) **Determinación de *Coliformes totales* NMP/cm³ según norma INEN 1529-6**

La técnica se utiliza para la determinación de *Coliformes totales* (NMP/cm³) en cualquier alimento destinado al consumo humano y en esta guía se aplica a:
Leche pasteurizada

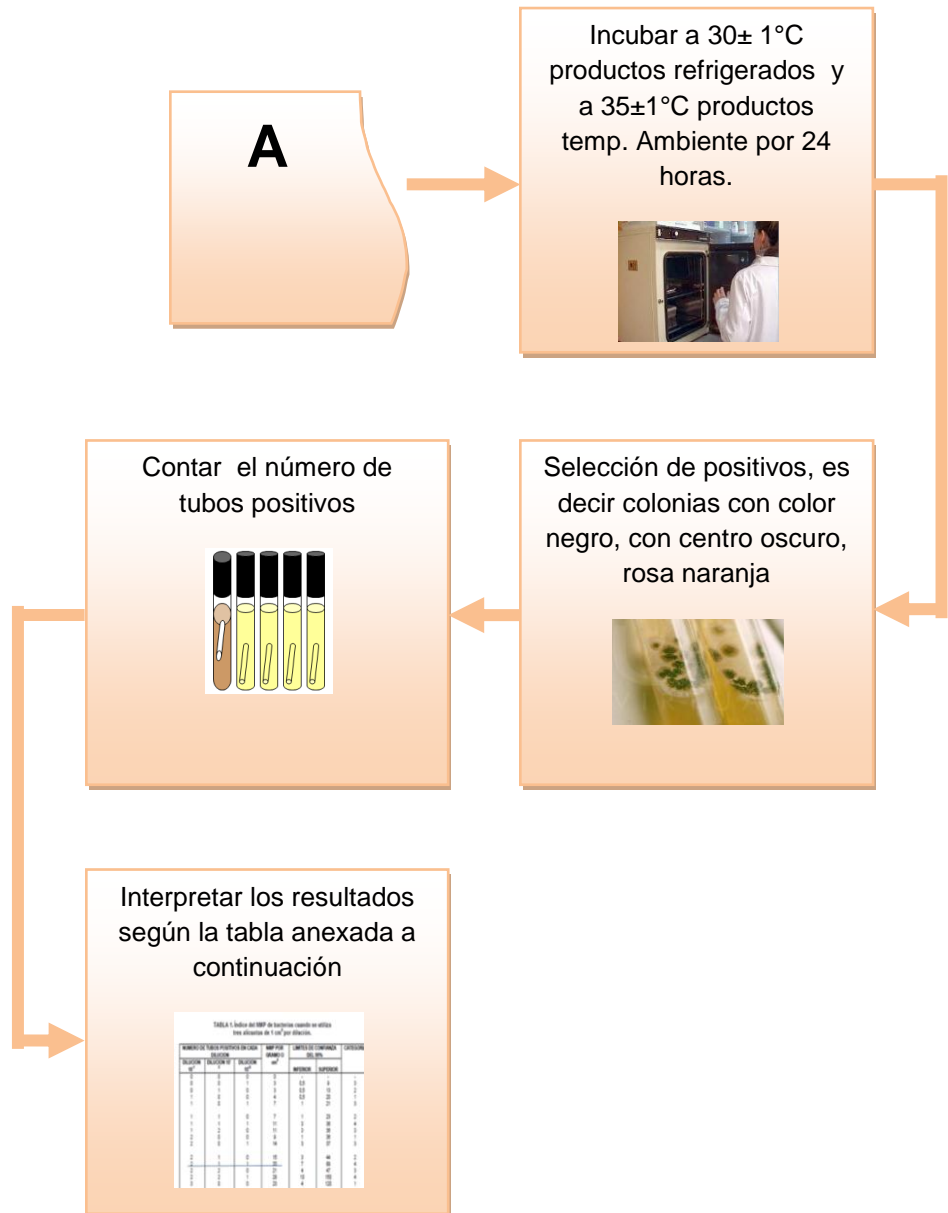
REACTIVOS y MEDIOS DE CULTIVO:

- Caldo verde brillante bilis-lactosa (BGBL)
- Agar Eosina azul de metileno (EMB)
- Agua peptona al 0,1%

PROCEDIMIENTO: La determinación debe realizarse por duplicado para cada muestra.

Figura 28: Procedimiento para la determinación de Coliformes totales (NMP/cm³)





CÁLCULOS: “Anotar los resultados de tubos positivos de cada dilución de la muestra y proceder de la siguiente manera. Elegir la dilución más alta en la que la presencia de coliformes es confirmada en los 3 tubos y también las dos diluciones más próximas. Determinar la relación de tubos y buscar en la tabla 1 de la Norma INEN 1529-6 el NMP que le corresponde.

Cuando las tres diluciones sucesivas elegidas son 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} el NMP obtenido de la tabla se mantiene ya que ese valor es el real. Si las tres diluciones sucesivas elegidas son 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} el NMP obtenido de la tabla se debe multiplicar por 10 y así se obtiene el NMP real. El NMP obtenido de la tabla se debe multiplicar por 100 si las tres diluciones sucesivas elegidas son 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} y así sucesivamente.” (NTE INEN 1529-6)

Ejemplo: si las diluciones 10^{-1} (1/10) y 10^{-2} (1/100) presentan resultados positivos confirmados en los tres tubos, la dilución 10^{-3} (1/1000) presenta un tubo positivo y la dilución 10^{-4} (1/10000) ningún tubo positivo, anotar los resultados de la siguiente manera:

Dilución	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Tubos positivos	3	3	1	0

Las diluciones elegidas serán 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} cuya relación de tubos positivos es 3-1-0; con esta relación según la tabla 1 de la Norma INEN 1529-6 le corresponde a un NMP de 43.

$$\text{NMP real} = 43 \times 10 = 430 \text{ coliformes/ g ó cm}^3$$

Si ninguna de las diluciones presenta 3 tubos positivos confirmados, seleccionar las diluciones más altas que tengan algún tubo positivo.

Ejemplo si se tiene los siguientes datos:

Dilución	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Tubos positivos	2	2	2	1	1

Las diluciones elegidas serán 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} cuya relación de tubos positivos es 2-1-1; con esta relación según la tabla 1 de la Norma INEN 1529-6 le corresponde a un NMP de 20.

$$\text{NMP real} = 20 \times 100 = 2000 \text{ coliformes/ g ó cm}^3$$

TABLA 1. Índice del NMP de bacterias cuando se utiliza tres alícuotas de 1cm ³ por dilución.						
NÚMERO DE TUBOS POSITIVOS EN CADA DILUCIÓN			NMP por gramo o cm ³	LÍMITES DE CONFIANZA DEL 99%.		CATEGORÍA
DILUCIÓN 10 ⁻¹	DILUCIÓN 10 ⁻²	DILUCIÓN 10 ⁻³		INFERIOR	SUPERIOR	
0	0	0	0	-	-	-
0	0	1	3	0,5	9	3
0	1	0	3	0,5	13	2
1	0	0	4	0,5	20	1
1	0	1	7	1	21	3
1	1	0	7	1	23	2
1	1	1	11	3	36	4
1	2	0	11	3	36	3
2	0	0	9	1	36	1
2	0	1	14	3	37	3
2	1	0	15	3	44	2
2	1	1	20	7	89	4
2	2	0	21	4	47	3
2	2	1	28	10	150	4
3	0	0	23	4	120	1
3	0	1	39	7	130	2
3	0	2	64	15	380	4
3	1	0	43	7	210	1
3	1	1	75	14	230	2
3	1	2	120	30	380	3

3	2	0	93	15	380	1
3	2	1	150	30	440	2
3	2	2	210	35	470	3
3	3	0	240	36	1300	1
3	3	1	460	71	2400	1
3	3	2	1100	150	4800	1

Fuente: NTE INEN 1529-6

d) **Determinación de *Coliformes totales* REP UFC/cm³ según norma INEN 1529-7**

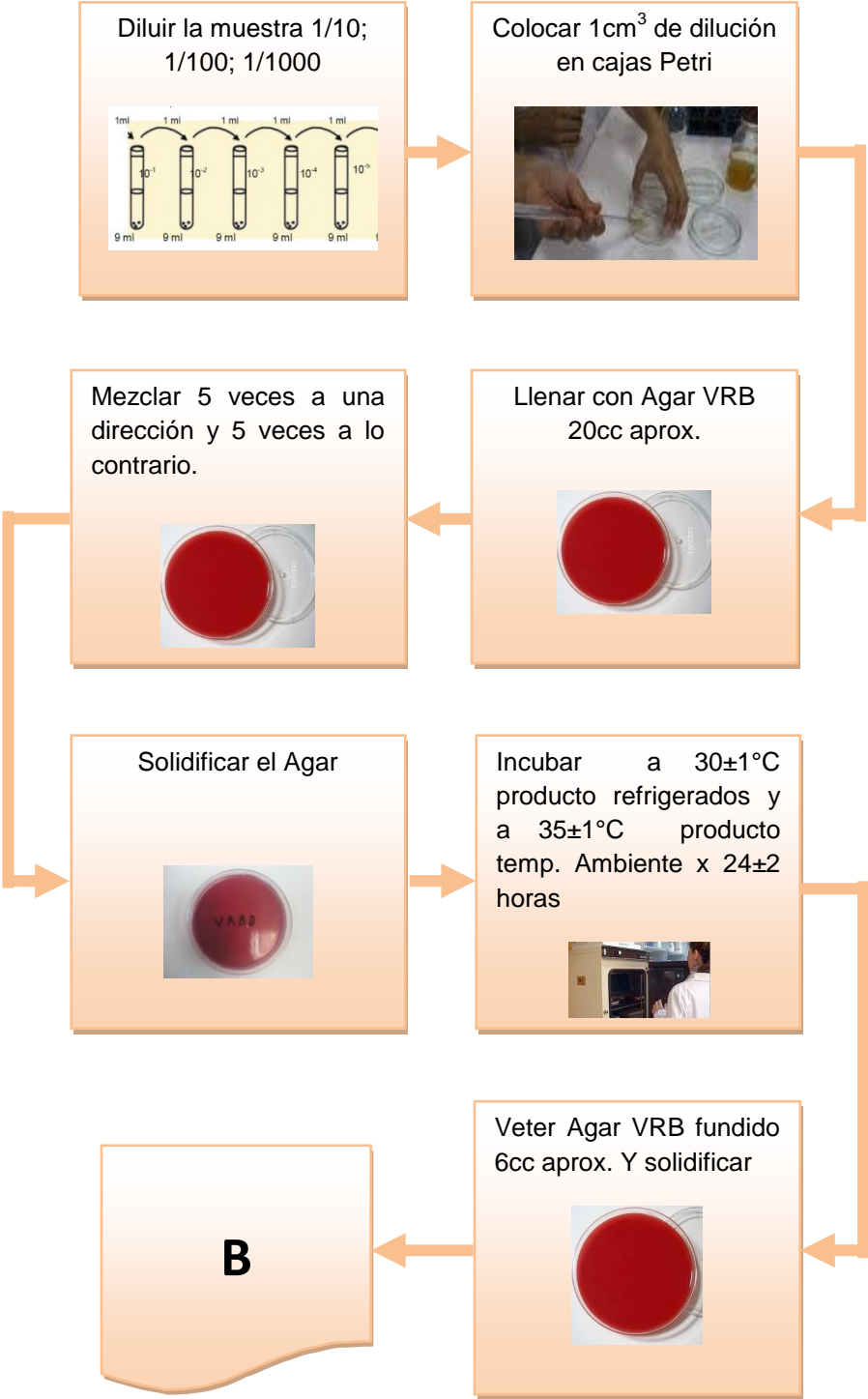
Ésta técnica se utiliza para la determinación de *Coliformes totales* (UFC/cm³) en cualquier alimento destinado al consumo humano. En esta guía se aplica a: Leche pasteurizada y Leches fermentadas (Yogur)

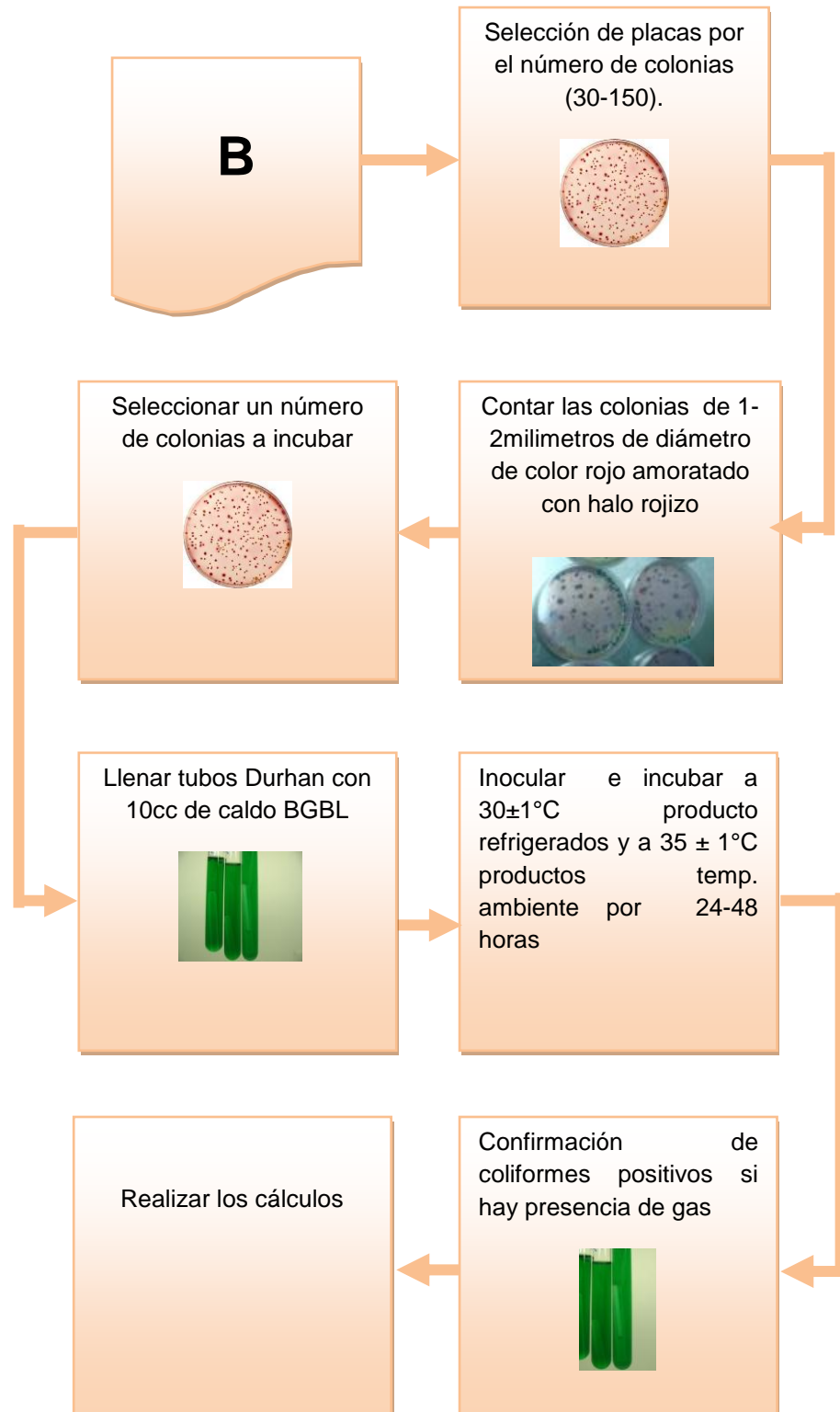
REACTIVOS y MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar Cristal Violeta- rojo neutro bilis (VRB)
- Agua peptona al 0,1%

PROCEDIMIENTO: La determinación debe realizarse por duplicado para cada muestra.

Figura 29: Procedimiento para la determinación de Coliformes totales (REP/cm³)





CÁLCULOS: Como la siembra se realiza por duplicado por cada dilucion, se deben contar el numero de colonias que existen en cada caja y obtener una media aritmetica (es decir sumar el numero de colonias contadas en las dos cajas de una dilucion y el resultado dividirlo para dos).

“El numero de microorganismo se calcula multiplicando el numero de colonias de coliformes formadas por el factor de dilucion como se puede observar en la siguiente formula:

$$\text{Coliformes/ g ó cm}^3 \text{ (=UFC/g ó cm}^3\text{)} = n \times f$$

Donde:

UFC= unidades formadoras de colonias

n= numero de colonias (resultado de la media aritmetica)

f= Factor de dilucion

(f=1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir);

(f=10¹=10 cuando la dilución ha sido 1/10);

(f=10²=100 cuando la dilución ha sido 1/100); y

(f=10³=1000 cuando la dilución ha sido 1/1000).” (NTE INEN 1529-7)

e) **Determinación de *Coliformes fecales* y *Escherichia coli* según norma INEN 1529-8**

Mediante ésta técnica se puede determinar *Coliformes fecales* y *Escherichia coli* en cualquier alimento destinado al consumo humano, y en la presente guía se aplica a:

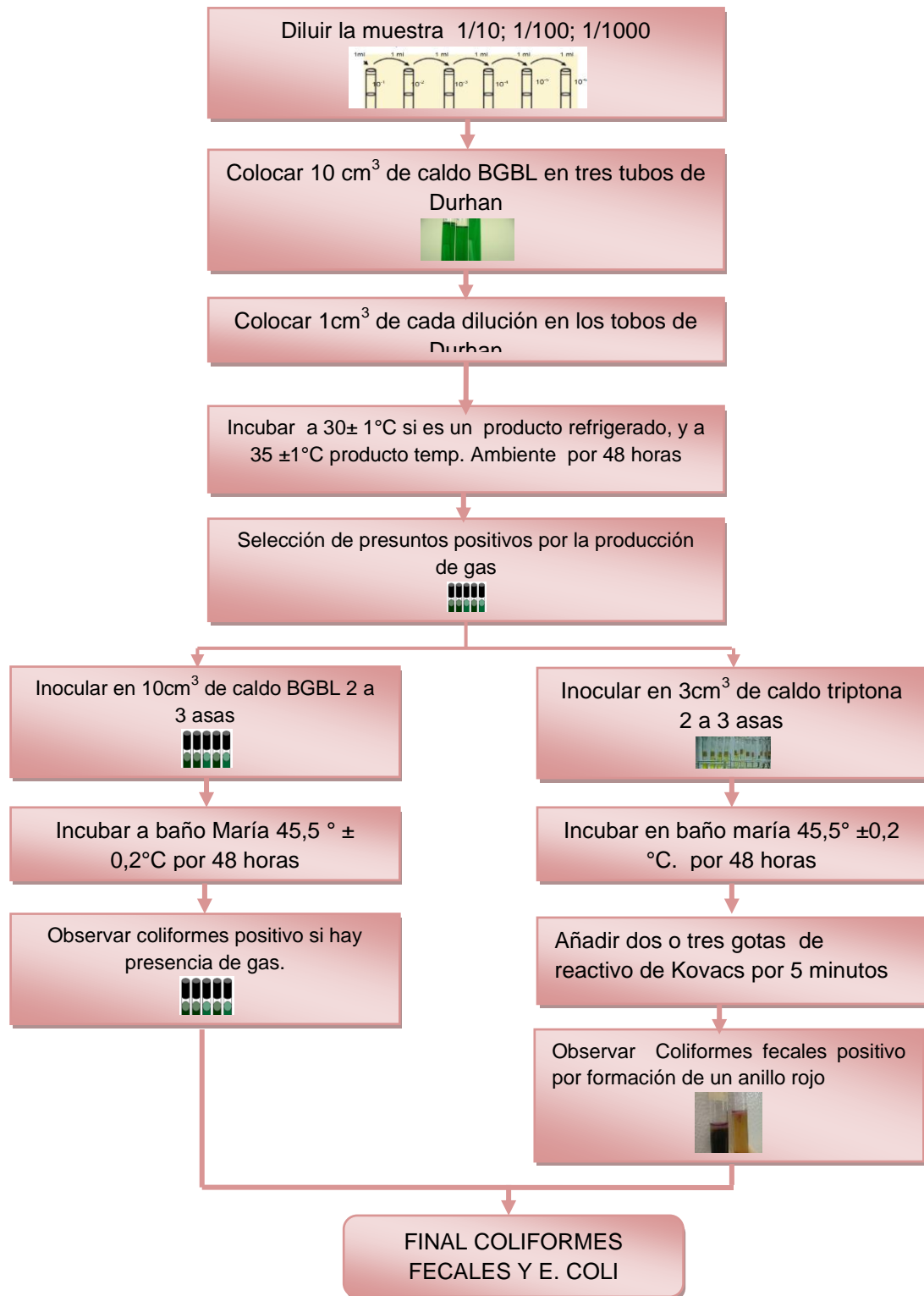
- Leche pasteurizada
- Leches fermentadas (Yogur)
- Queso Fresco
- Carne molida
- Productos cárnicos crudos
- Productos cárnicos cocidos y
- Productos cárnicos precocidos congelados

REACTIVOS y MEDIOS DE CULTIVO:

- Caldo verde brillante bilis-lactosa (BGBL) o similar.
- Caldo triptona.
- Agar eosina azul metileno (EMB).
- Agar de contaje en placa (PCA).
- Caldo MR-VP.
- Reactivos de Kovacs.
- Solución de rojo de metilo.
- Solución de cretina al 0,5%.
- Solución alcohólica de α -naftol al 6%.
- Solución de hidróxido de potasio al 40%.
- Agar citrato de Simons.
- Solución alcohol-acetona.
- Solución fenicada de cristal de violeta al 1%.
- Solución fenicada de fucsina básica al 1%.
- Solución de lugol.
- Agua peptona al 0,1%

PROCEDIMIENTO: La determinación debe realizarse por duplicado para cada muestra.

Figura 30: Procedimiento para la determinación de Coliformes fecales y E. coli.



Confirmación de E. coli

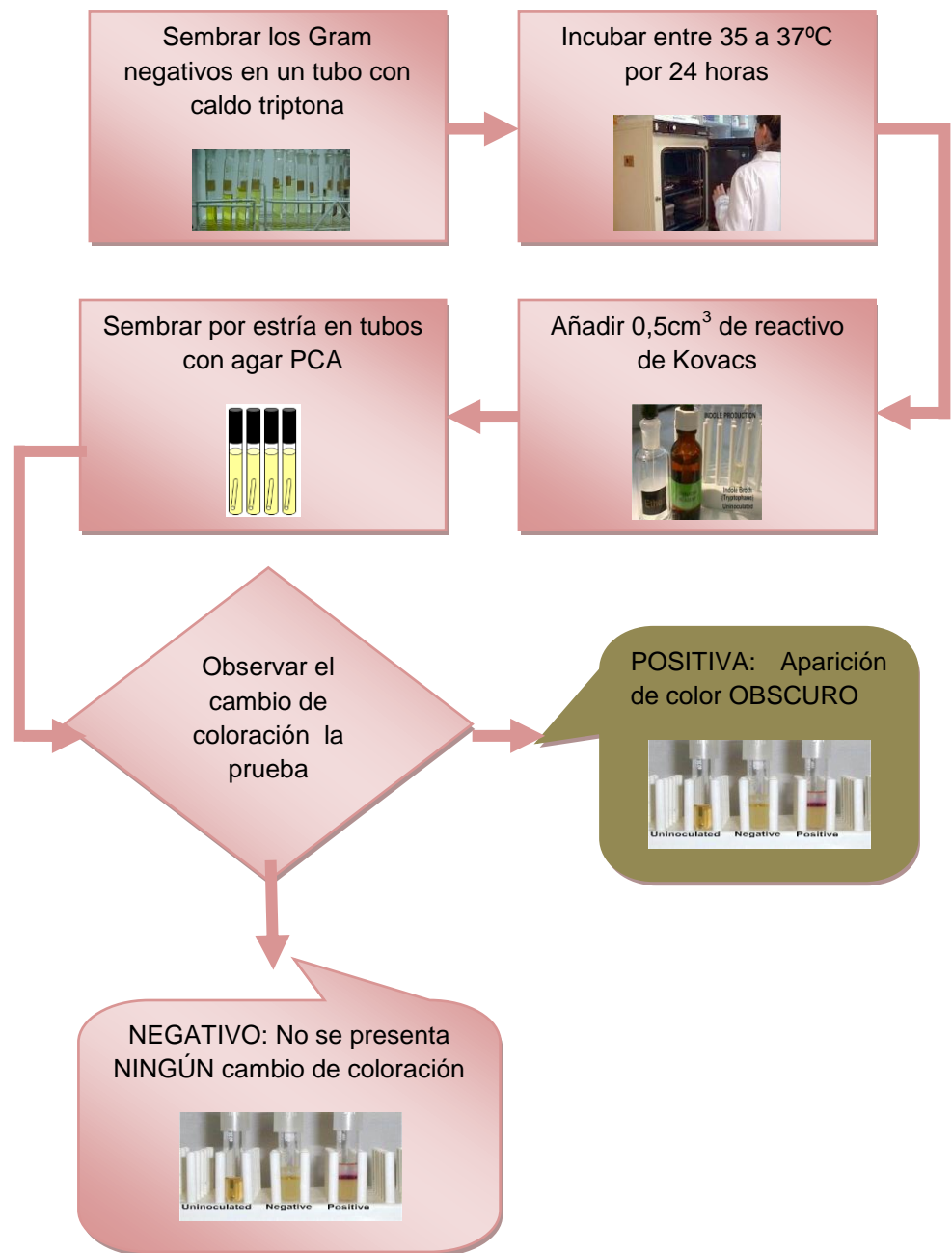
Figura 31: Procedimiento para la confirmación de E.coli



Prueba de IMVIC.

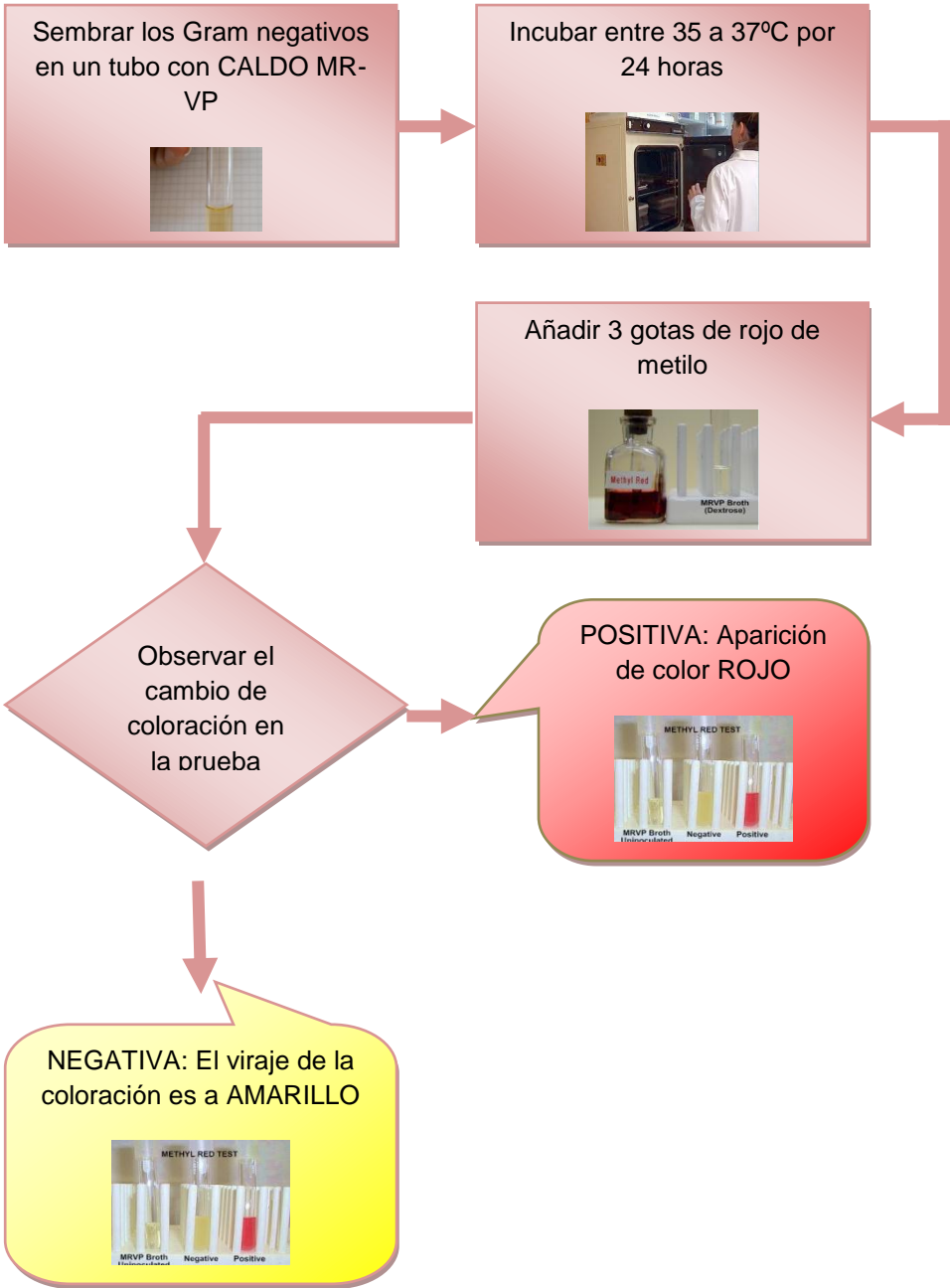
a) Prueba del Indol

Figura 32: Prueba confirmatoria IMVIC- Indol



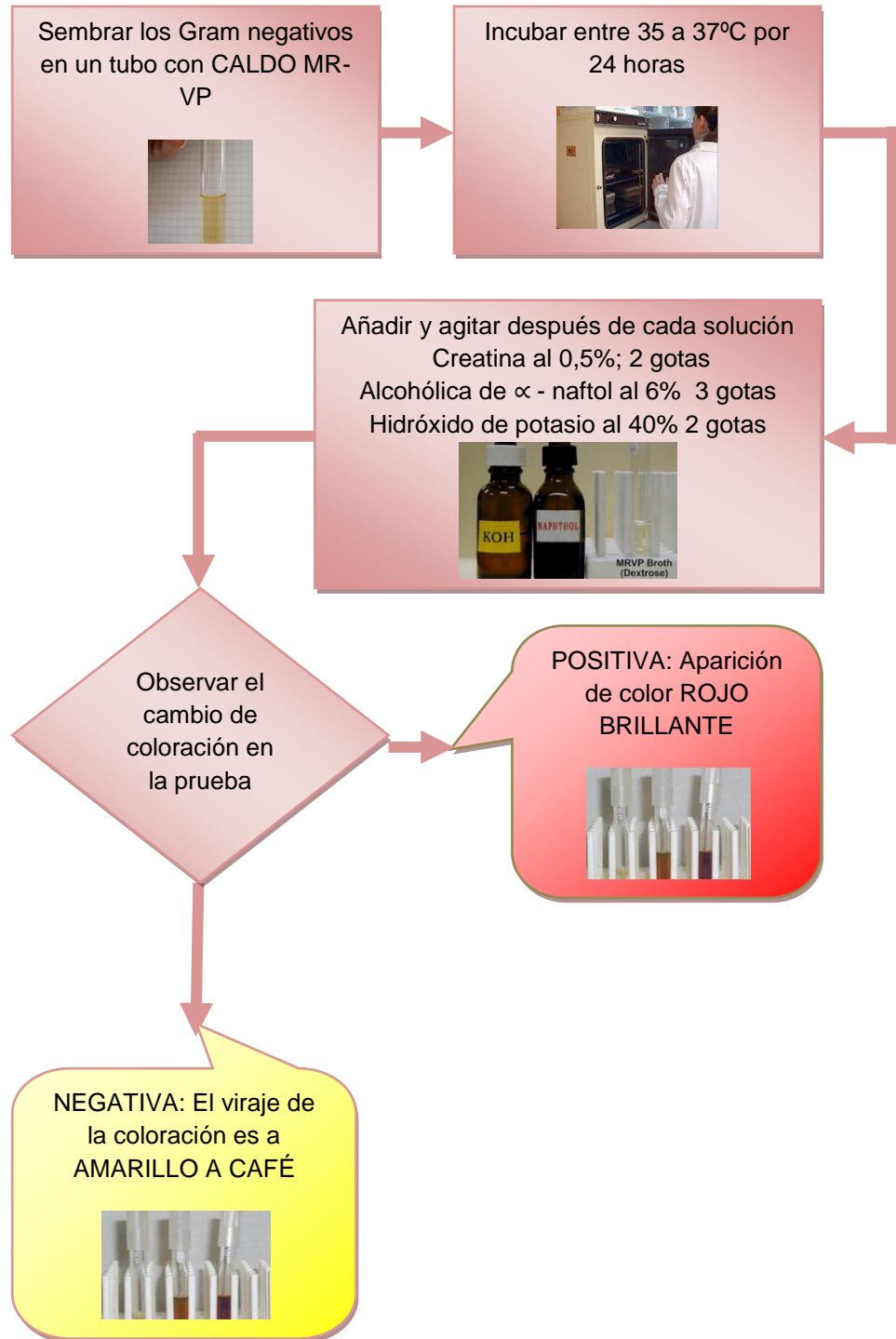
b) Prueba rojo de metilo

Figura 33: Prueba confirmatoria IMVIC- Rojo de metilo



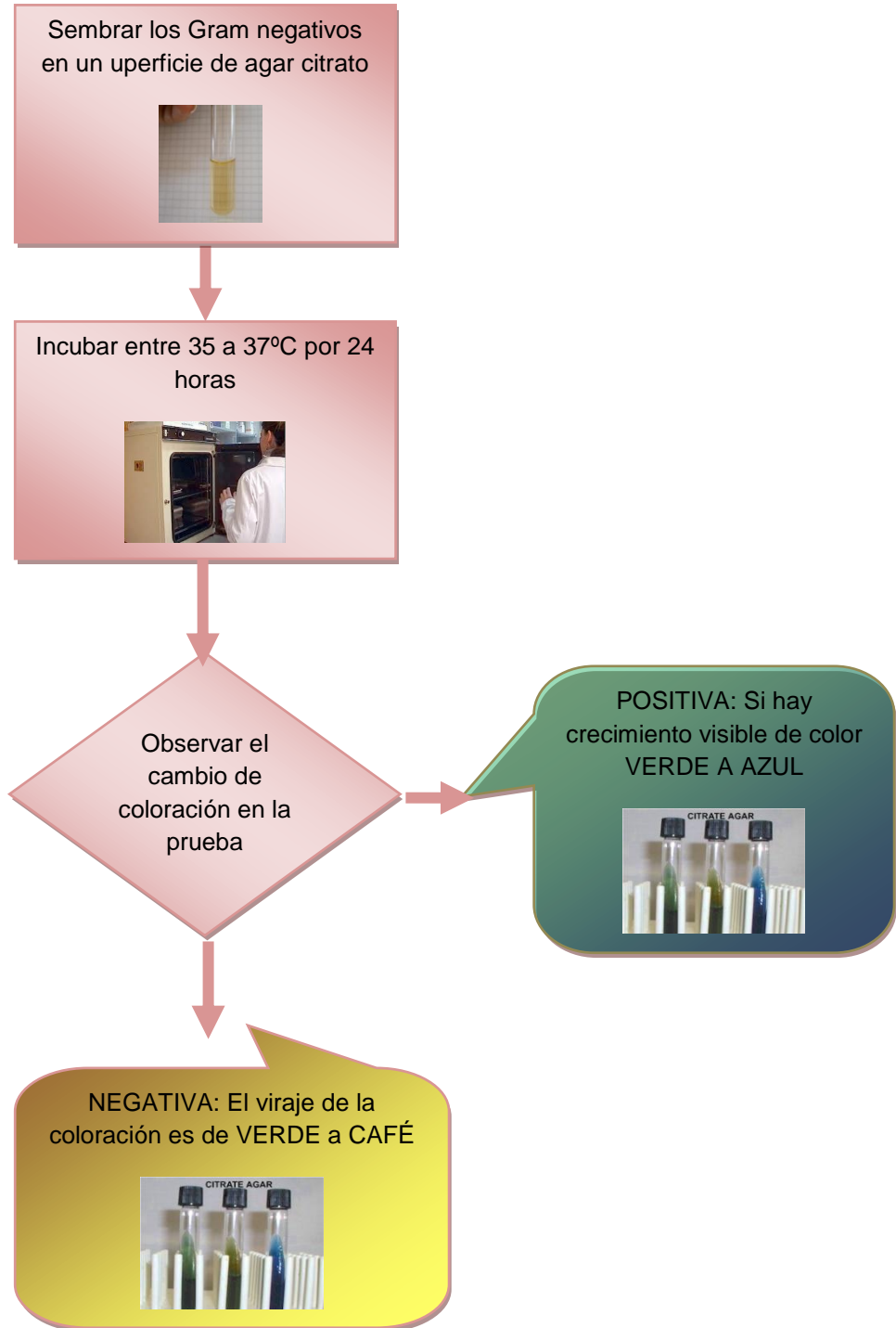
c) Prueba de Voges- Proskaver (VP).

Figura 34: Prueba confirmatoria IMVIC- VP



d) Prueba para la utilización del citrato

Figura 35: Prueba confirmatoria IMVIC- Utilización del citrato



CÁLCULOS: Tanto para Coliformes fecales como para E. coli el cálculo del NMP se realiza de la misma manera.

Anotar los resultados de tubos positivos de cada dilución de la muestra y proceder de la siguiente manera.

“Elegir la dilución más alta en la que la presencia de coliformes es confirmada en los 3 tubos y también las dos diluciones más próximas. Determinar la relación de tubos y buscar en la tabla 1 de la Norma INEN 1529-6 el NMP que le corresponde.

Cuando las tres diluciones sucesivas elegidas son 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} el NMP obtenido de la tabla se mantiene ya que ese valor es el real. Si las tres diluciones sucesivas elegidas son 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} el NMP obtenido de la tabla se debe multiplicar por 10 y así se obtiene el NMP real. El NMP obtenido de la tabla se debe multiplicar por 100 si las tres diluciones sucesivas elegidas son 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} y así sucesivamente.” (NTE INEN 1529-8)

Ejemplo: si en la determinación de Coliformes fecales se obtiene los siguientes resultados:

COLIFORMES FECALES				
Dilución	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Tubos positivos	3	2	2	1

Las diluciones elegidas serán 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} cuya relación de tubos positivos es 3-2-2; con esta relación según la tabla 1 de la Norma INEN 1529-6 le corresponde a un NMP de 210.

$$\text{NMP real} = 210 \text{ coliformes fecales/g ó cm}^3$$

Si ninguna de las diluciones presenta 3 tubos positivos confirmados, seleccionar las diluciones más altas que tengan algún tubo positivo.

Ejemplo: si en la determinación de E. coli se tiene los siguientes datos:

Dilución	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Tubos positivos	2	2	1	0

Las diluciones elegidas serán 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ cuya relación de tubos positivos es 2-1-0; con esta relación según la tabla 1 de la Norma INEN 1529-6 le corresponde a un NMP de 15.

$$\text{NMP real} = 15 \times 10 = 150 \text{ E. coli/ g ó cm}^3$$

TABLA I CLASIFICACIÓN DE LOS COLIFORMES POR LAS PRUEBAS IMViC					
	Gas en caldo B.O.B.L 44-45,5°C	Prueba del indol 44-45,5°C	MR	VP	Crecimiento en Citrato
E. coli:					
-Típico (tipo I)	+	+	+	-	-
-Atípico (tipo II)	-	-	+	-	-
Intermedios:					
-Típicos (tipo II)	-	+	+	-	+
-Atípicos (tipo I)	-	-	+	-	+
Enterobacter- aerógenos:					
-Típico (tipo I)	-	-	-	+	+
-Atípico (tipo II)	-	+	-	+	+
Enterobacter- cioacae	-	-	-	+	+
Irregulares:					
-Tipo I	-				
-Tipo II	+	-	-	-	-
-Tipo VI	+	-	+	+	+
Irregulares otros tipos	V ¹	V ¹	V ¹		V ¹

Fuente: NTE INEN 1529-8

TABLA 1. Índice del NMP de bacterias cuando se utiliza tres alícuotas de 1cm ³ por dilución.						
NÚMERO DE TUBOS POSITIVOS EN CADA DILUCIÓN			NMP por gramo o cm ³	LÍMITES DE CONFIANZA DEL 99%.		CATEGORÍA
DILUCIÓN 10 ⁻¹	DILUCIÓN 10 ⁻²	DILUCIÓN 10 ⁻³		INFERIOR	SUPERIOR	
0	0	0	0	-	-	-
0	0	1	3	0,5	9	3
0	1	0	3	0,5	13	2
1	0	0	4	0,5	20	1
1	0	1	7	1	21	3
1	1	0	7	1	23	2
1	1	1	11	3	36	4
1	2	0	11	3	36	3
2	0	0	9	1	36	1
2	0	1	14	3	37	3
2	1	0	15	3	44	2
2	1	1	20	7	89	4
2	2	0	21	4	47	3
2	2	1	28	10	150	4
3	0	0	23	4	120	1
3	0	1	39	7	130	2
3	0	2	64	15	380	4
3	1	0	43	7	210	1
3	1	1	75	14	230	2
3	1	2	120	30	380	3

3	2	0	93	15	380	1
3	2	1	150	30	440	2
3	2	2	210	35	470	3
3	3	0	240	36	1300	1
3	3	1	460	71	2400	1
3	3	2	1100	150	4800	1

Fuente: NTE INEN 1529-6

f) Determinación de *Staphylococcus Aureus* según norma INEN 1529-14

Ésta técnica se utiliza para la determinación de células viables de *Staphylococcus Aureus* (UFC/ g ó cm³) en cualquier alimento destinado al consumo humano. En esta guía se aplica a:

Queso Fresco

Carne molida

Productos cárnicos crudos

Productos cárnicos curados- madurados

Productos cárnicos cocidos y

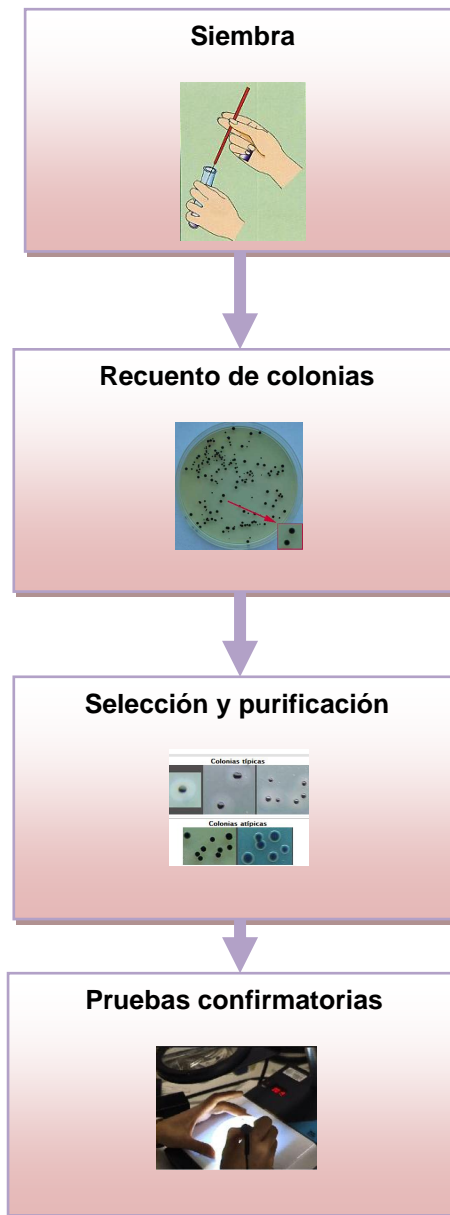
Productos cárnicos precocidos congelados

REACTIVOS y MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar azul de O-toluidina-DNA
- Agar Baird Parker.
- Caldo infusión cerebro corazón (ICC) o caldo triptona soya (TSB).
- Plasma de conejo con heparina (EDTA).
- Agua peptona al 0,1%

PROCEDIMIENTO: La determinación debe realizarse por duplicado para cada muestra

Figura 36: Procedimiento para la determinación de Staphylococcus Aureus



A continuación se describen cada una de estas etapas

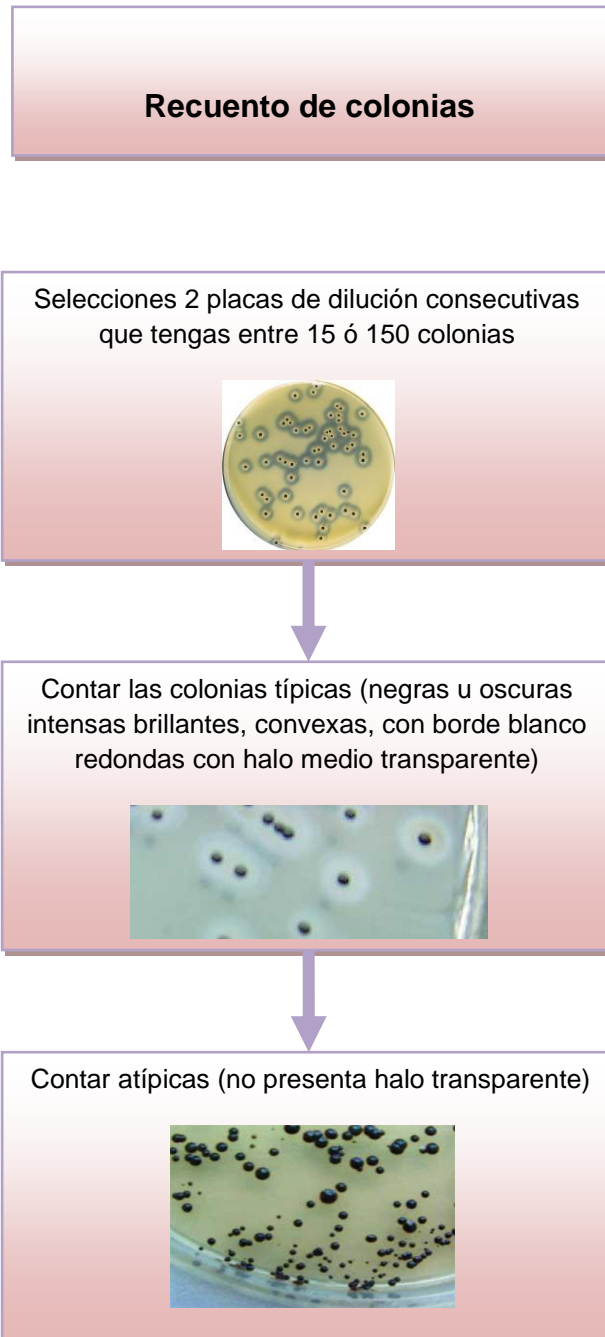
a) **Siembra**

Figura 37: Siembra para la determinación de Staphylococcus Aureus



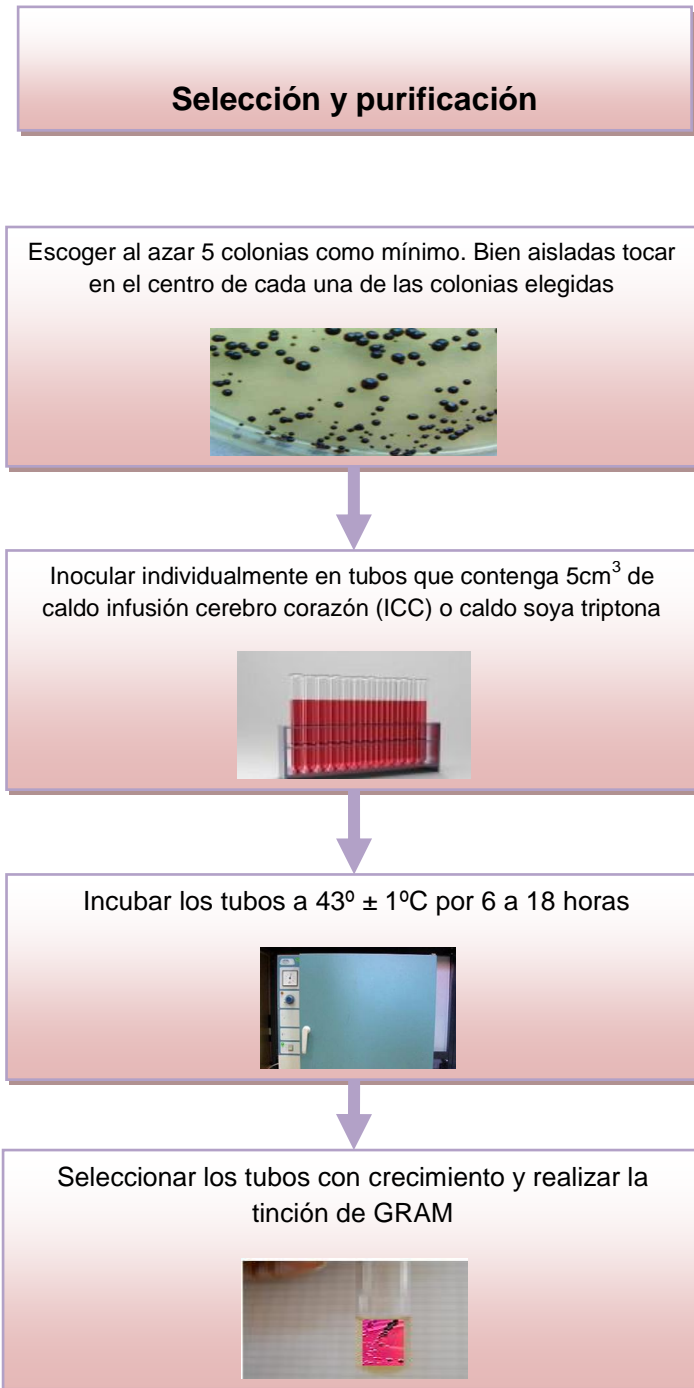
b) Recuento de colonias

Figura 38: Recuento de colonias para la determinación de *Staphylococcus Aureus*



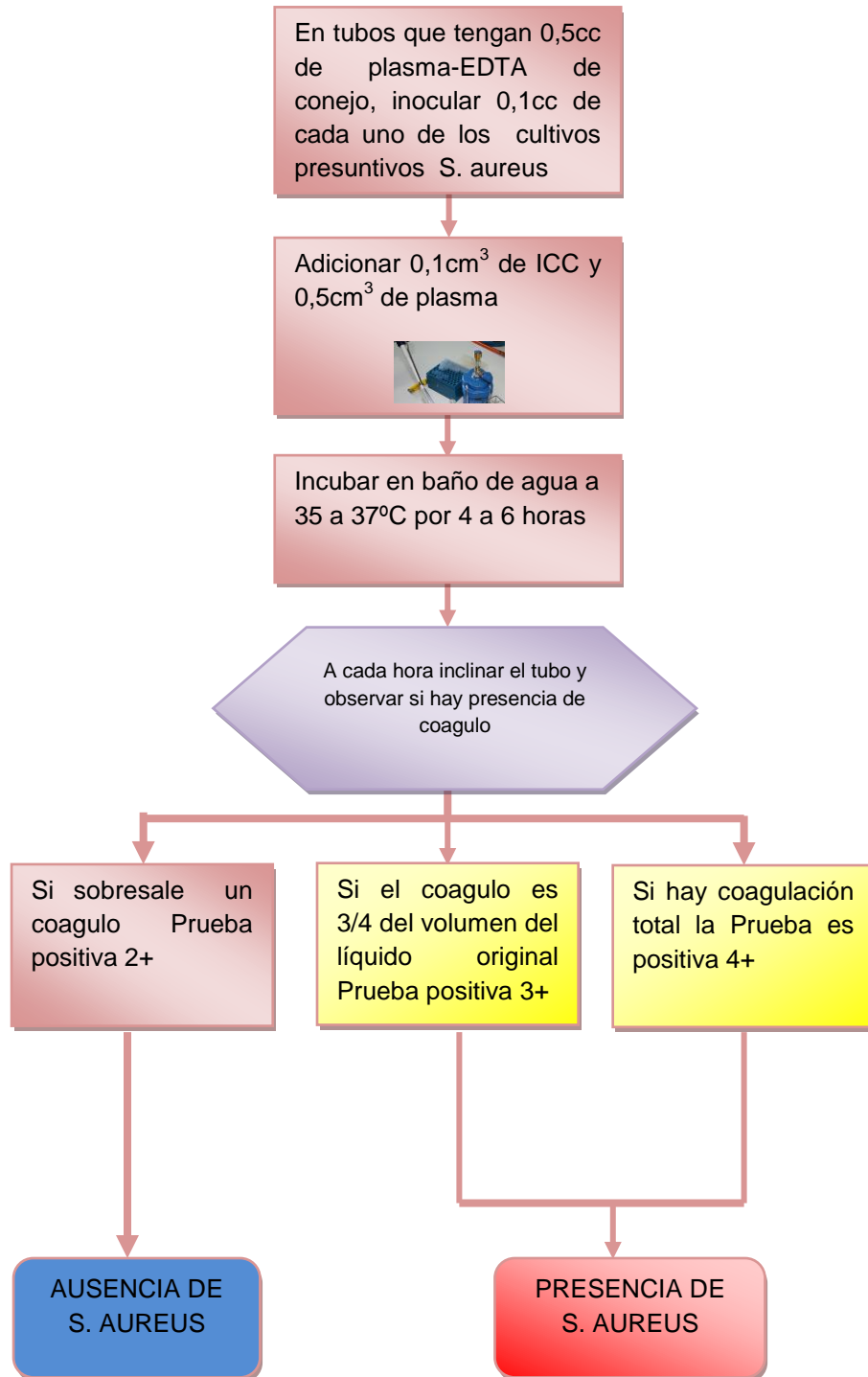
c) Selección y purificación de colonias

Figura 39: Selección y purificación de colonias para la determinación de *Staphylococcus Aureus*



d) Pruebas confirmatorias

Figura 40: Pruebas confirmatorias para Staphylococcus Aureus



CÁLCULOS: “En cada placa, calcular el número de *S. aureus* relacionado el número de colonias típicas sometidas a confirmación que dieron coagulasa positiva con el total de las colonias típicas contadas.

Si en las placas seleccionadas para el recuento se han desarrollado colonias típicas y atípicas, realizar los cálculos por separado, luego sumar estos dos valores para obtener el número de *S. aureus* por placa.

Cuando por lo menos el 80% de las colonias típicas y atípicas sometidas a conformación son coagulasa positiva, tomar el número de *S. aureus* presuntivo contado, como el número de *S. aureus* por placa.” (NTE INEN 1529-14)

“Cálculo del número (N) de unidades formadoras de colonias (UFC), de *S. aureus* por centímetro cúbico o gramo de muestra.

• Placas que contienen entre 15 y 150 colonias. El número de UFC de *S. aureus* se calcula mediante la siguientes ecuaciones:

$$N = \frac{\text{número total de colonias contadas o calculadas}}{\text{cantidad total de muestra sembrada}}$$

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Dónde:

$\sum c$ = suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas.

V= volumen inoculado en cada caja Petri.

n_1 = número de placas de la primera dilución seleccionada.

n_2 = número de placas de la segunda dilución seleccionada.

d = factores de dilución de la primera seleccionada

(d= 1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir);

(d=0,1 cuando la dilución ha sido 1/10);

(d=0,01 cuando la dilución ha sido 1/100); y

(d=0,001 cuando la dilución ha sido 1/1000).

Redondear los resultados obtenidos a dos cifras significativas.” (NTE INEN 1529-14)

Ejemplo: Se requiere determinar el número de unidades formadoras de colonias de *S. aureus* en una muestra de carne. Se ha realizado las siguientes diluciones de la muestra: 1/100 y 1/1000 y cada dilución se ha sembrado por duplicado (siembra en dos placas).

Se ha sembrado 0,1mL (=0,1cm³) en cada placa.

Del conteo de colonias formadas se obtiene los siguientes resultados:

DILUCIÓN	CONTEO PLACA 1		CONTEO PLACA 2	
	Colonias típicas	Colonias atípicas	Colonias típicas	Colonias atípicas
1/100 (es decir 10 ⁻²)	120 colonias típicas	20 colonias atípicas	100 colonias típicas	30 colonias atípicas
1/1000 (es decir 10 ⁻³)	20 colonias típicas	0 colonias atípicas	15 colonias típicas	0 colonias atípicas

Dilución 10⁻²

Placa 1: 120 típicas y 20 atípicas.

Siete de 11 colonias típicas seleccionadas fueron coagulasa positiva, por tanto 76 colonias son consideradas de *S. aureus*.

$$\frac{7 \text{ coagulasa positiva}}{11 \text{ típicas seleccionadas}} \times 120 \text{ típicas totales} = 76,36 \text{ colonias de } S. \text{ aureus}$$

Y dos de 5 colonias atípicas seleccionadas fueron coagulasa positiva, por tanto 8 de las 20 colonias atípicas son consideradas de *S. aureus*.

$$\frac{2 \text{ coagulasa positiva}}{5 \text{ típicas seleccionadas}} \times 20 \text{ típicas totales} = 8 \text{ colonias de S. aureus}$$

$$\text{Total de colonias de S. aureus} = 76 + 8 = 84$$

Placa 2: 100 típicas y 30 atípicas

Seis de las 10 colonias típicas seleccionadas fueron coagulasa positiva, por tanto 60 de las 100 se consideran S. aureus.

$$\frac{6 \text{ coagulasa positiva}}{10 \text{ típicas seleccionadas}} \times 100 \text{ típicas totales} = 60 \text{ colonias de S. aureus}$$

Y dos de 5 colonias atípicas seleccionadas fueron coagulasa positiva, por tanto 12 de las 30 colonias atípicas son consideradas de S. aureus

$$\frac{2 \text{ coagulasa positiva}}{5 \text{ típicas seleccionadas}} \times 30 \text{ típicas totales} = 12 \text{ colonias de S. aureus}$$

$$\text{Total de colonias de S. aureus} = 60 + 12 = 72$$

Dilución 10^{-3}

Placa 1: 20 típicas y 0 atípicas.

Tres de 5 colonias típicas seleccionadas fueron coagulasa positiva, por tanto 12 de las 20 colonias son consideradas de S. aureus.

$$\frac{3 \text{ coagulasa positiva}}{5 \text{ típicas seleccionadas}} \times 20 \text{ típicas totales} = 12 \text{ colonias de S. aureus}$$

$$\text{Total de colonias de S. aureus} = 12$$

Placa 2: 15 típicas y 0 atípicas

Cuatro de las 5 colonias típicas seleccionadas fueron coagulasa positiva, es decir el 80% por tanto 15 son consideradas de *S. aureus*.

Total de colonias de *S. aureus* = 15

Reemplazar los datos en la fórmula:

$$N = \frac{84 + 72 + 12 + 15}{0,1 \times (2 + 0,1 \times 2) \times 0,01}$$

$$N = \frac{183}{0,1 \times (2 + 0,2) \times 0,01}$$

$$N = \frac{183}{0,1 \times (2,2) \times 0,01}$$

$$N = \frac{183}{0,002}$$

$N = 91500$ microorganismos por gramo o cm^3

Redondeando

$N = 92000 = 9,2 \times 10^4$ microorganismos por gramo o cm^3

• “Estimación de números pequeños. Si las placas sembradas con la dilución más concentrada presentan menos de 15 colonias de *S. aureus* los cálculos se deben realizar con la siguiente fórmula:

$$N_E = m \times \frac{1}{V_i}$$

En donde:

N_E = número estimado de colonias por centímetro cúbico o gramo de muestra.

m = medida de las colonias confirmadas en ambas placas.

V_i = volumen inoculado.

f = factores de dilución (valor inverso de la dilución de la muestra).

($f=1$ cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir);

($f=10$ cuando la dilución ha sido 1/10);

($f=100$ cuando la dilución ha sido 1/100); y

($f=1000$ cuando la dilución ha sido 1/1000).

Redondear los resultados obtenidos a dos cifras significativas. Cuando la tercera cifra comenzando por la izquierda es menos que 5, mantener inalterada la segunda cifra. Si la tercera cifra es mayor o igual a 5, incrementar en una unidad la segunda cifra. Expresar como número entre 1,0 y 9,9 multiplicando por 10^x , donde la x es la correspondiente potencia de 10." (NTE INEN 1529-14)

g) Determinación de Mohos y levaduras según norma INEN 1529-10

Ésta técnica se utiliza para la determinación de mohos y levaduras por gramo o por centímetro cúbico. En esta guía se aplica a:

Leche fermentadas (yogur)

Queso Fresco y

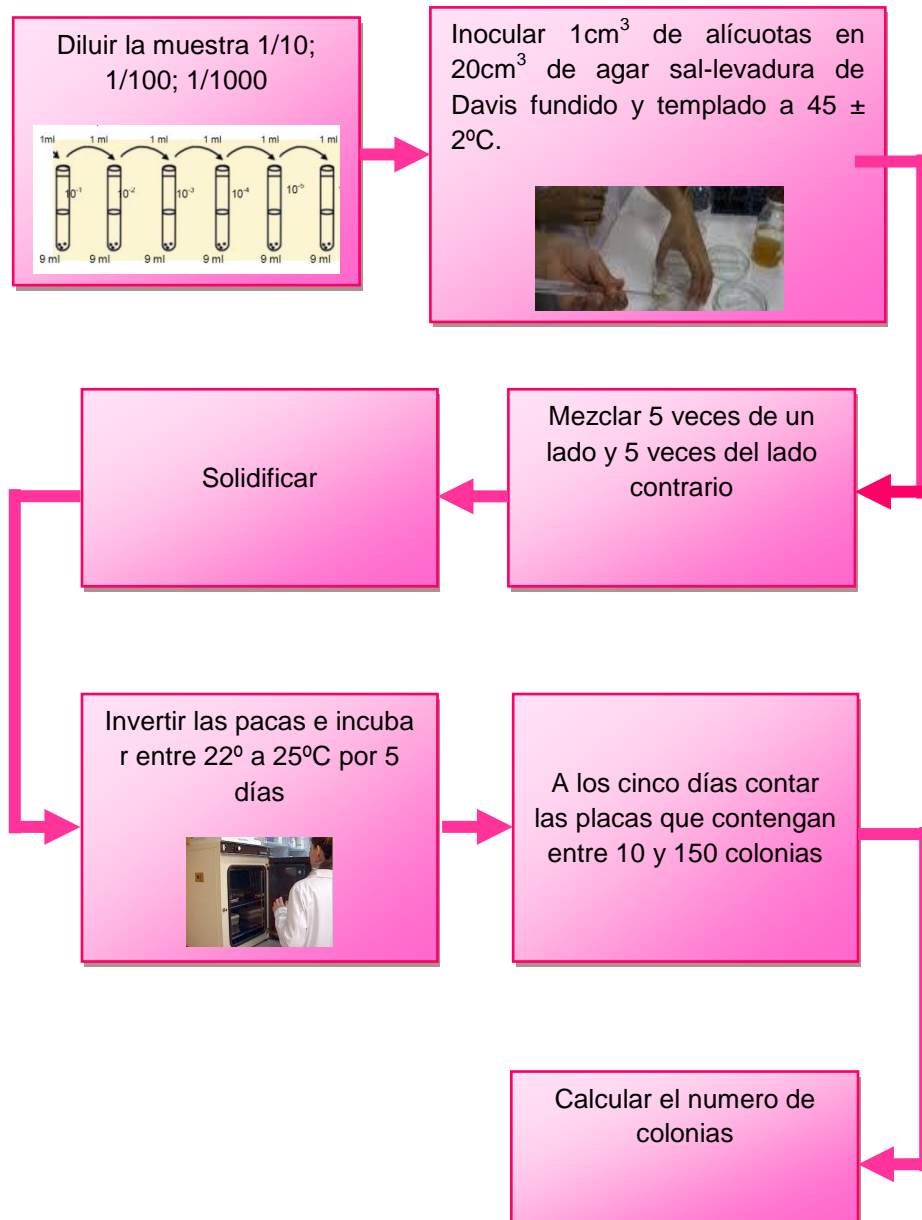
Manjar o dulce de leche

REACTIVOS y MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar sal-levadura de Davis o similar
- Agua peptona al 0,1%

PROCEDIMIENTO: La determinación debe realizarse por duplicado para cada muestra

Figura 41: Procedimiento para la determinación de Mohos y Levaduras



CÁLCULOS: “Contar el número de colonias mohos y levaduras conjuntamente o por separado en cada caja Petri y aplicar la siguiente formula:

$$N = \frac{\text{número total de colonias contadas o calculadas}}{\text{cantidad total de muestra sembrada}}$$

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Dónde:

$\sum c$ = suma de todas las colonias contadas en todas las placas elegidas.

V = volumen del inóculo sembrado en cada caja Petri.

n_1 =número de placas contadas de la primera dilución seleccionada.

n_2 = número de placas contadas de la segunda dilución seleccionada.

d = factores de dilución de la primera seleccionada

($d= 1$ cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir);

($d=0,1$ cuando la dilución ha sido 1/10);

($d=0,01$ cuando la dilución ha sido 1/100); y

($d=0,001$ cuando la dilución ha sido 1/1000).

Redondear los resultados obtenidos a dos cifras significativas.” (NTE INEN 1529-10)

Ejemplo: Se requiere determinar el número de mohos y levaduras en una muestra de manjar. Se ha realizado las siguientes diluciones de la muestra: 1/100 y 1/1000 y cada dilución se ha sembrado por duplicado (siembra en dos placas).

Se ha sembrado 1mL (=1cm³) en cada placa.

Del conteo de colonias formadas se obtiene los siguientes resultados:

DILUCIÓN	CONTEO PLACA 1	CONTEO PLACA 2
1/100 (es decir 10^{-2})	83 colonias	97 colonias
1/1000 (es decir 10^{-3})	33 colonias	28 colonias

Remplazar los datos en la fórmula:

$$N = \frac{83 + 97 + 33 + 28}{1 \times (2 + 0,1 \times 2) \times 0,01}$$

$$N = \frac{241}{1 \times (2 + 0,2) \times 0,01}$$

$$N = \frac{241}{1 \times (2,2) \times 0,01}$$

$$N = \frac{241}{0,022}$$

$$N = 10954 \text{ Microorganismos por gramo o cm}^3$$

Redondeando $N = 11000 = 1,1 \times 10^4$ microorganismos por gramo o cm^3

h) Determinación de Salmonella según norma INEN 1529-15

Esta técnica se utiliza para la detección de Salmonella en cualquier alimento destinado al consumo humano. En esta guía se aplica a:

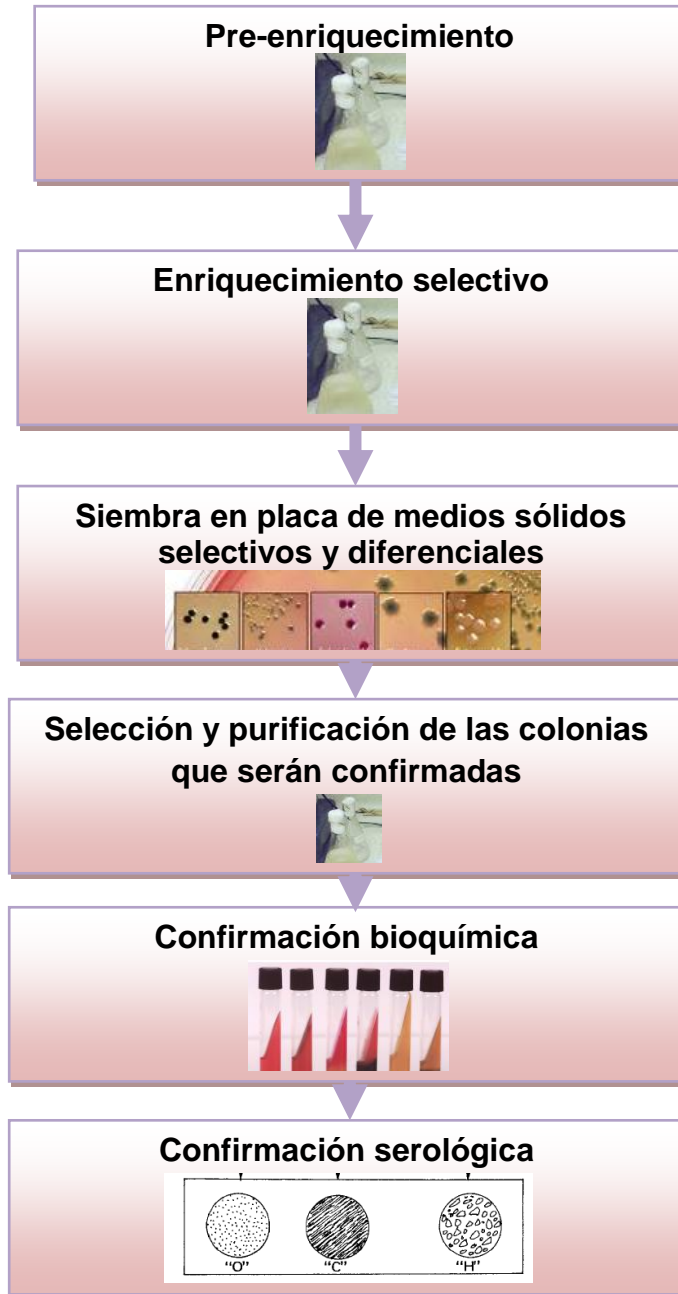
- Queso Fresco
- Carne molida
- Productos cárnicos crudos
- Productos cárnicos curados- madurados
- Productos cárnicos cocidos y
- Productos cárnicos precocidos congelados

REACTIVOS y MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar bismuto-sulfito (BS)
- Agar citrato de Simmon
- Agar cristal-violeta rojo-neutro bilis lactosa
- Agar fenilalanina
- Agar hierro lisina (LIA)
- Agar hierro triple-azúcar (TSI)
- Agar nutritivo semisólido
- Agar SS
- Agar urea o caldo urea
- Agar verde-brillante rojo-fenol(BG)
- Caldo base con púrpura de bromocresol.
- Caldo lisina-descarboxilase
- Caldo MR-VP
- Caldo selenito cistina
- Caldo tetrionato (Muller Kauffmann).
- Caldo triptona (Ljutov)
- Caldo de soya trípica (TSB)
- Caldo nutritivo
- Leche descremada en polvo
- Solución de gelatinasa al 5%.
- Solución de hidróxido de sodio 1N
- Solución de alcohólica de α naftol al 6%.
- Solución de ácido clorhídrico 1N
- Solución de KOH al 40%.
- Solución fisiológica
- Solución de creatina al 0,5%
- Solución fisiológica formalizada.
- Solución de ONPG (O-nitrofenil β -D-galactopiranosida)
- Solución verde brillante al 1%.
- Reactivo de Kovacs.
- Sulfito de potasio en polvo
- Rojo de metilo
- Tergitol aniónico 7
- Tritón X-100.
- Antisueros "Vi" y polivalentes "O" y "H"
- Agua peptona tamponada

PROCEDIMIENTO: La determinación debe realizarse por duplicado para cada muestra.

Figura 42: Procedimiento para la determinación de Salmonella



A continuación se describe cada etapa

a. Pre-enriquecimiento

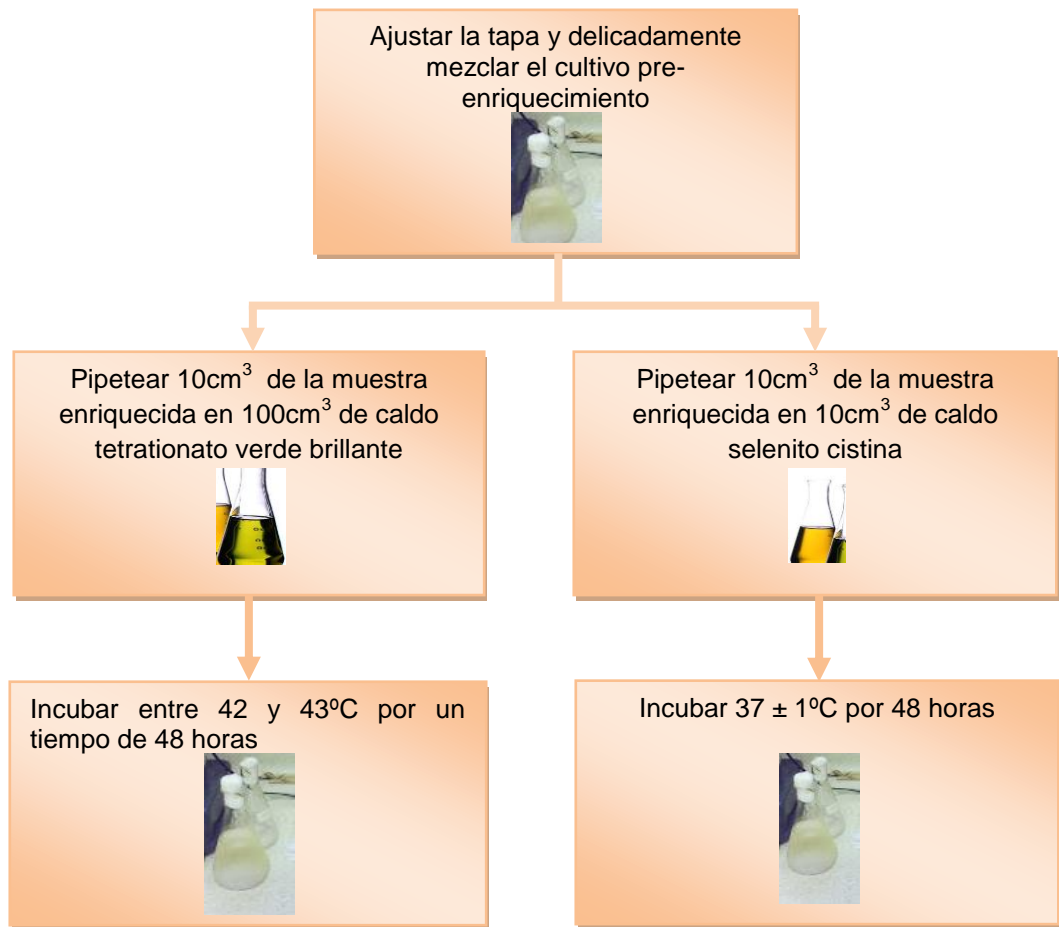
Figura 43: Pre-enriquecimiento para la determinación de Salmonella



b. Enriquecimiento selectivo

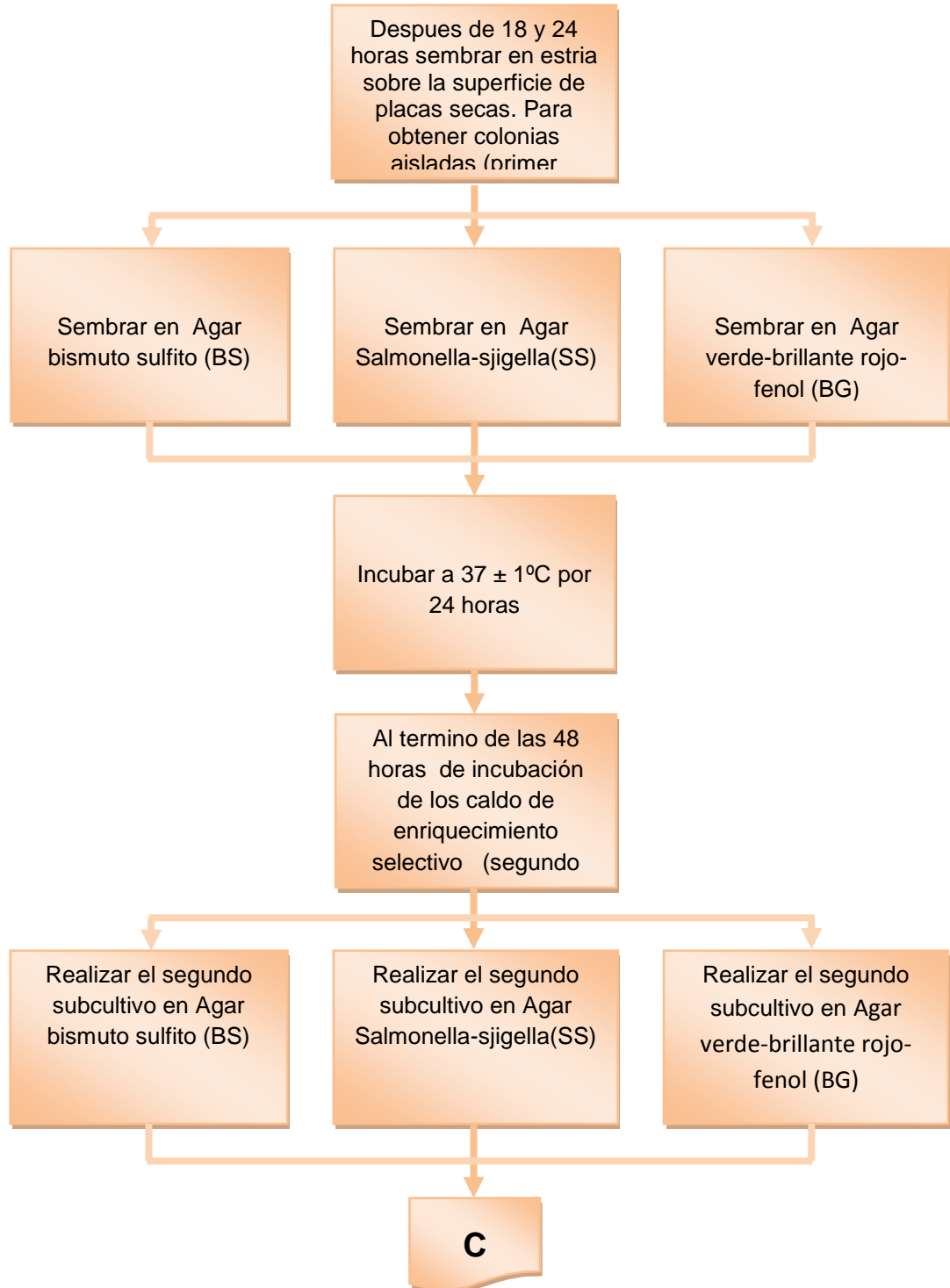
Antes de usar el caldo tetrionato, agregar $4,5 \text{ cm}^3$ de una solución yodo-yoduro y $2,25 \text{ cm}^3$ de solución de verde brillante al 0,1%. El medio una vez adicionado de yodo no debe calentarse y debe usarse el mismo día de su preparación.

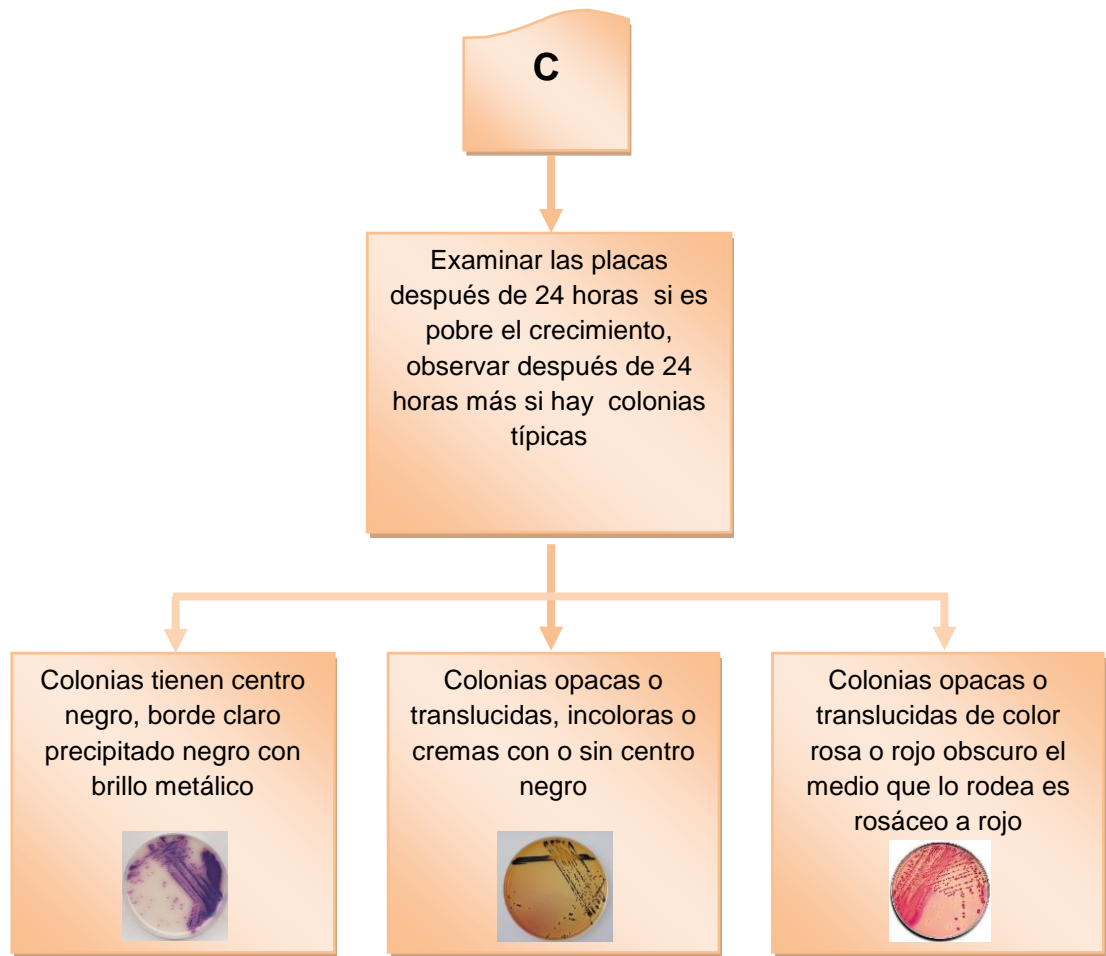
Figura 44: Enriquecimiento para la determinación de Salmonella



c. Siembra en placa de medios selectivos y diferenciales

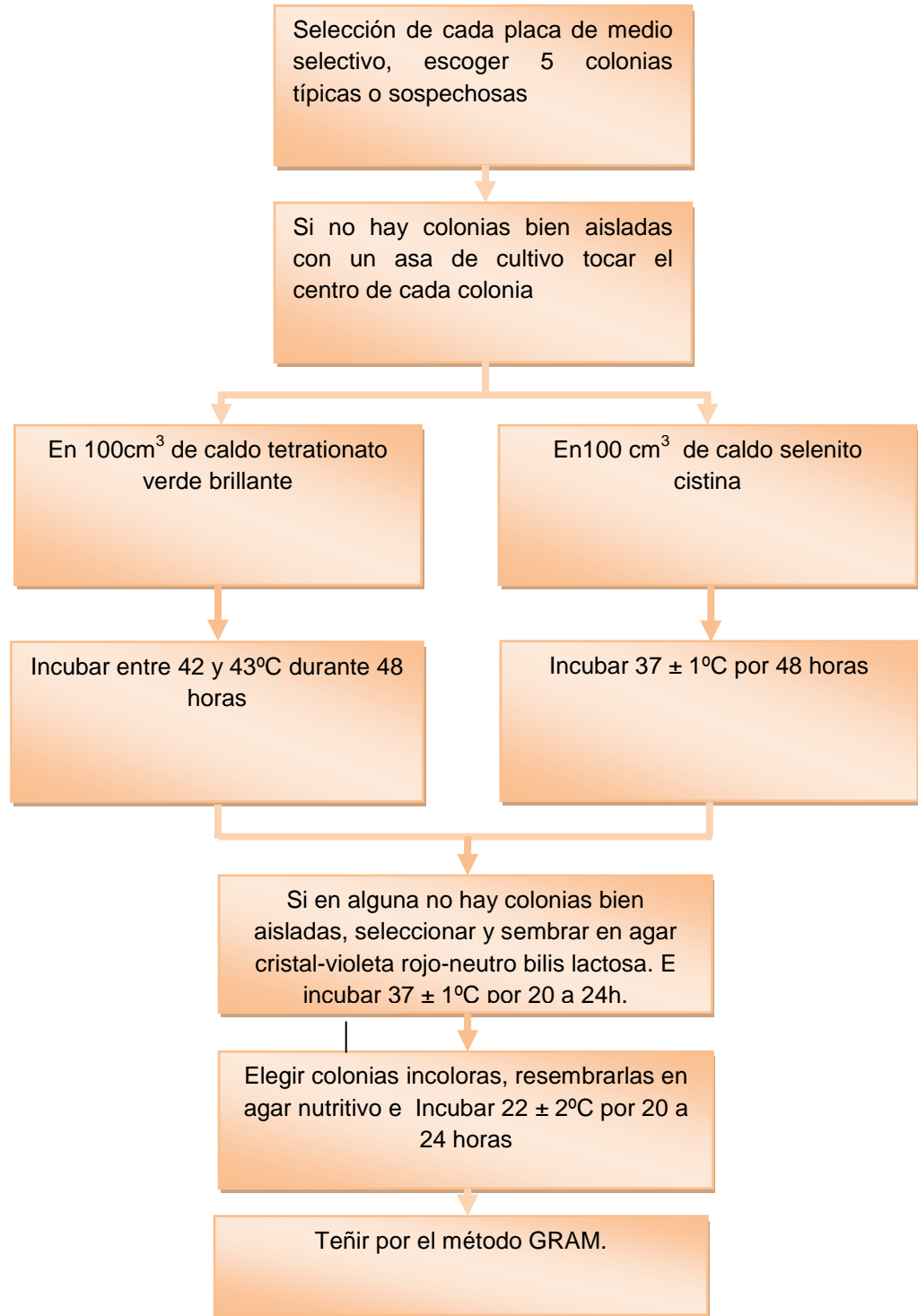
Figura 45: Siembra en placa para la determinación de Salmonella





d. Selección y purificación de las colonias que serán confirmadas

Figura 46: Selección y purificación de colonias para la determinación de Salmonella



e. Confirmación bioquímica

Figura 47: Prueba de la ureasa

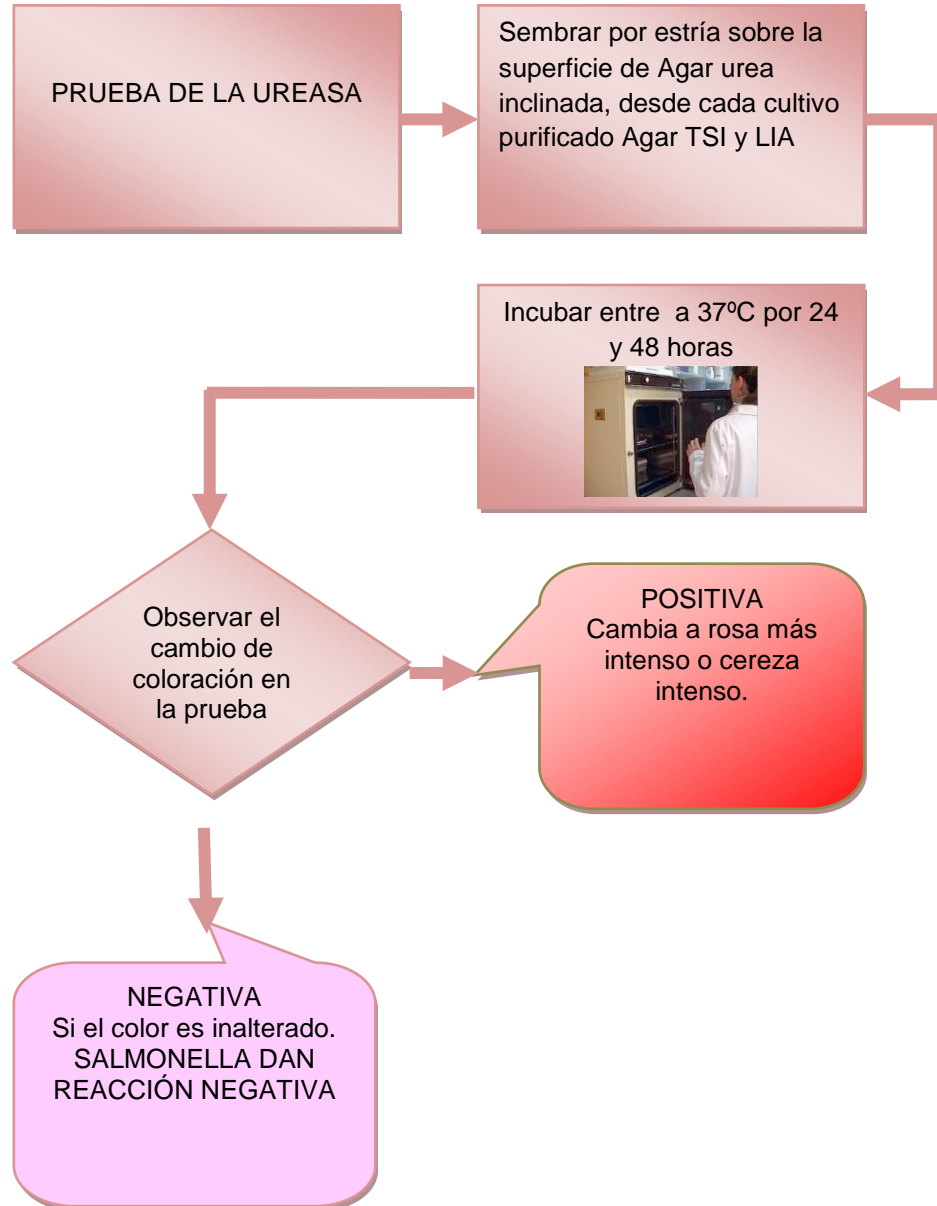


Figura 48: Prueba de la Lisina

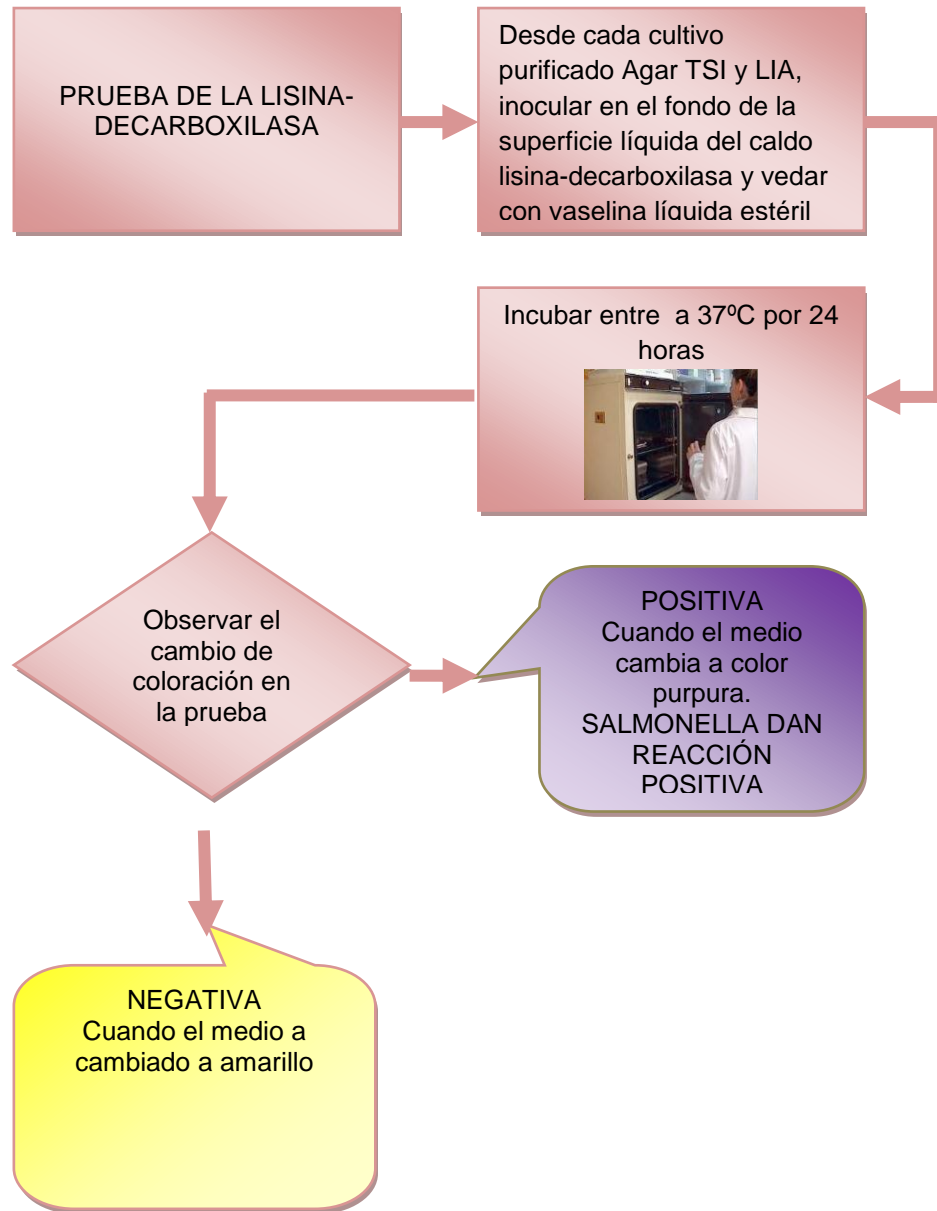
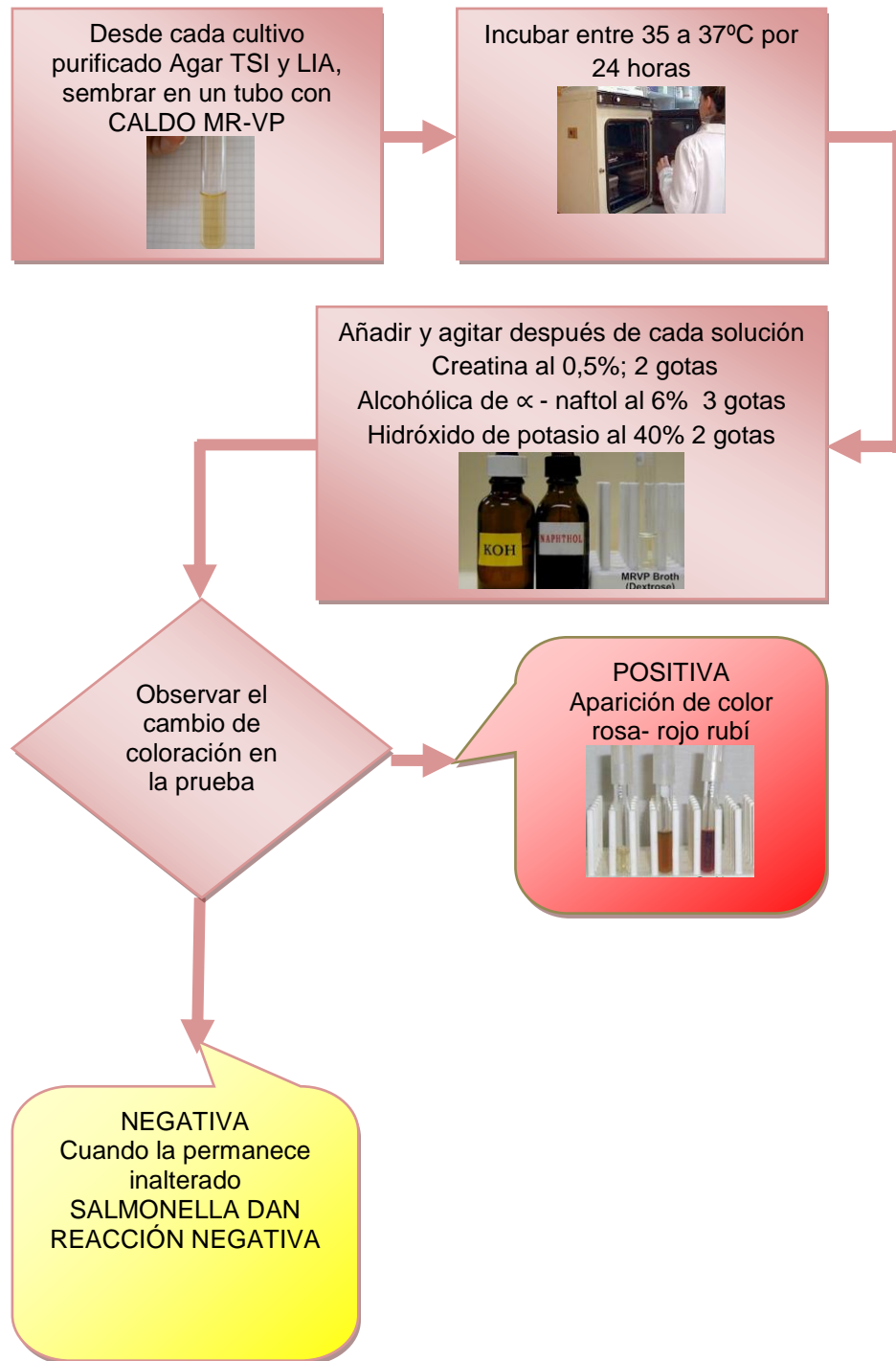


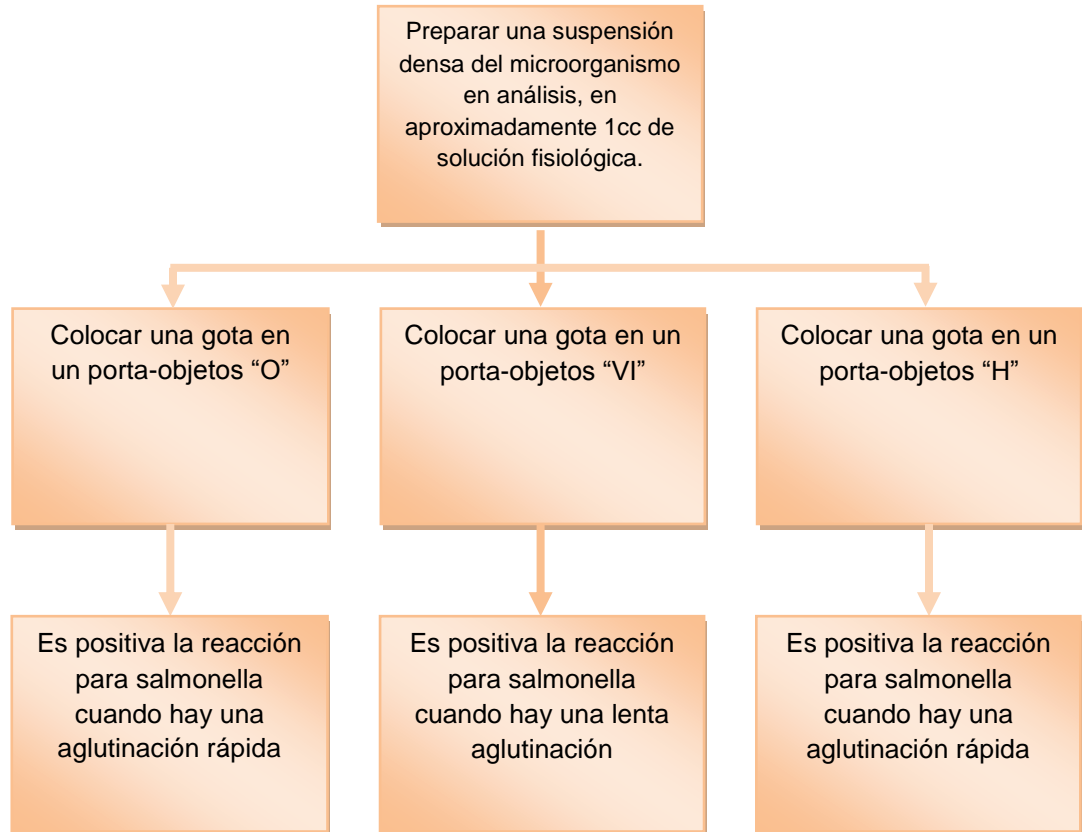
Figura 49: Prueba de Voges-Proskauer



f. Confirmación serológica

Para la determinación en porta-objetos de los antígenos “O” “H” y “Vi” de las salmonellas utilizar las colonias procedentes del crecimiento en TSI y LIA.

Figura 50: Confirmación serológica de Salmonella



CÁLCULOS: Si en ninguna de las placas de agar selectivo sembradas con el cultivo de enriquecimiento selectivo, se desarrolla una colonia de Salmonella, reportar : No se aisló Salmonella en 25g de muestra examinada. Caso contrario si a partir de uno o de ambos medios de enriquecimiento selectivo se aísla Salmonella en las placas de agar selectivo, reportar Se aisló Salmonella en 25g de muestra analizada.

i) Determinación de *Clostridium sulfito reductores* (*Clostridium Perfringens*) según norma INEN 1529-18

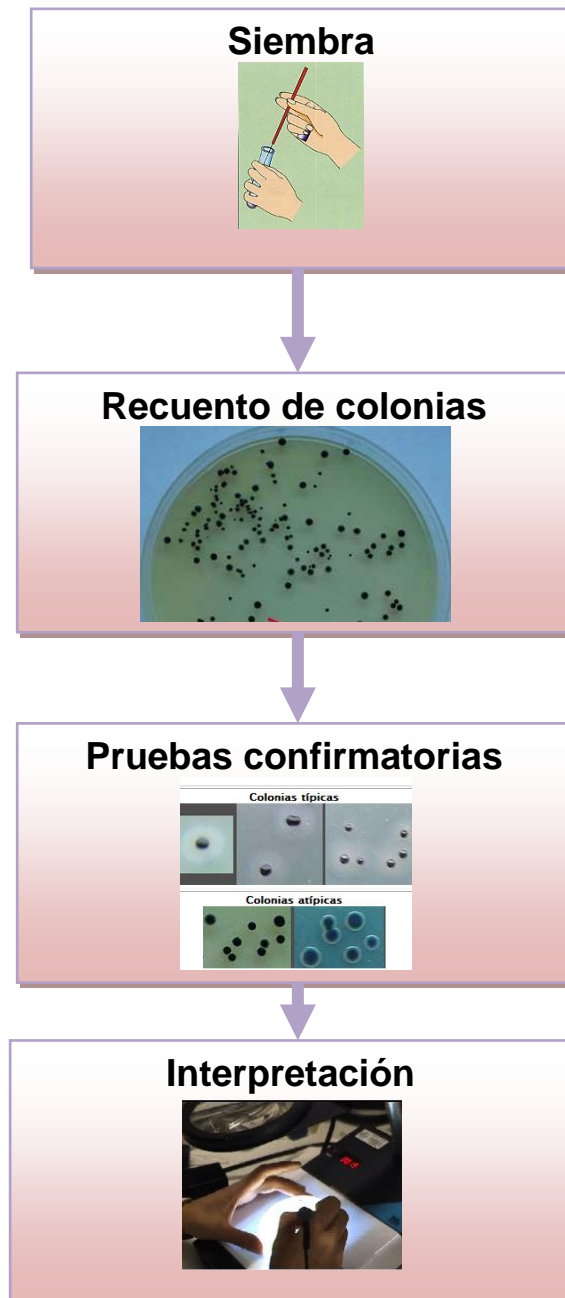
Ésta técnica se utiliza para la determinación de *Clostridium perfringens* en cualquier alimento destinado al consumo humano. En esta guía se aplica a: Carne molida y Productos cárnicos curados- madurados

REACTIVOS y MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar TSN
- Agar triptosa-sulfit-cicloserina TSC
- Agua peptona 0,1%
- Medio SIM
- Reactivo de Kovacs
- Medio tioglicolato fluido
- Vaselina líquida

PROCEDIMIENTO: La determinación debe realizarse por duplicado para cada muestra

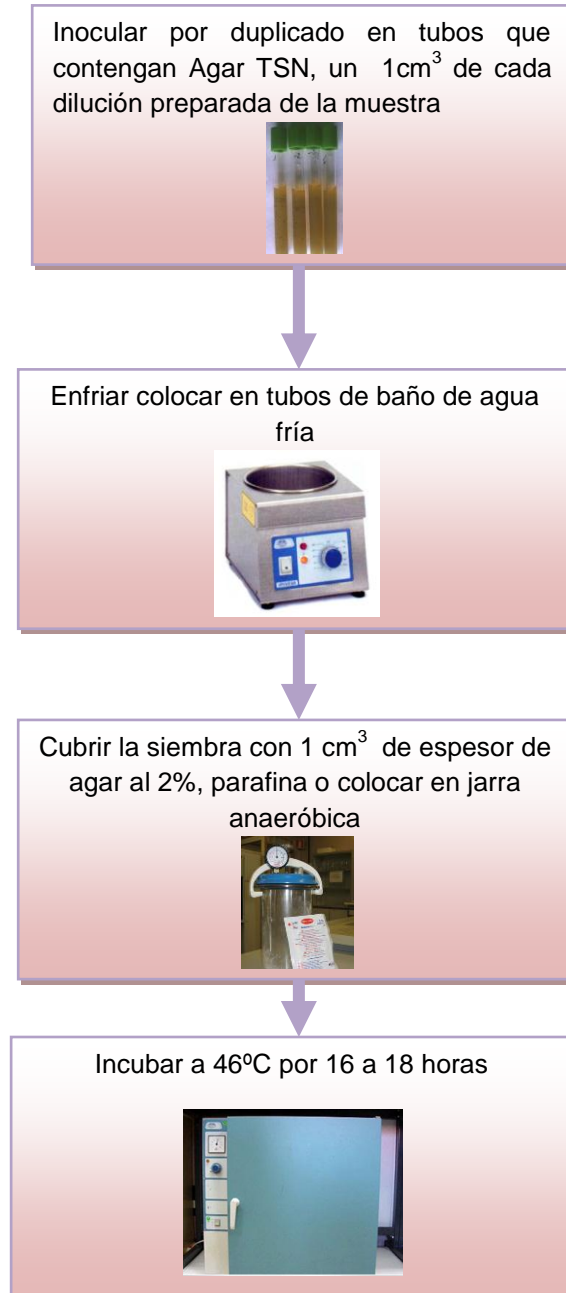
Figura 51: Procedimiento para la determinación de Clostridium sulfito reductores



A continuación se describe cada etapa.

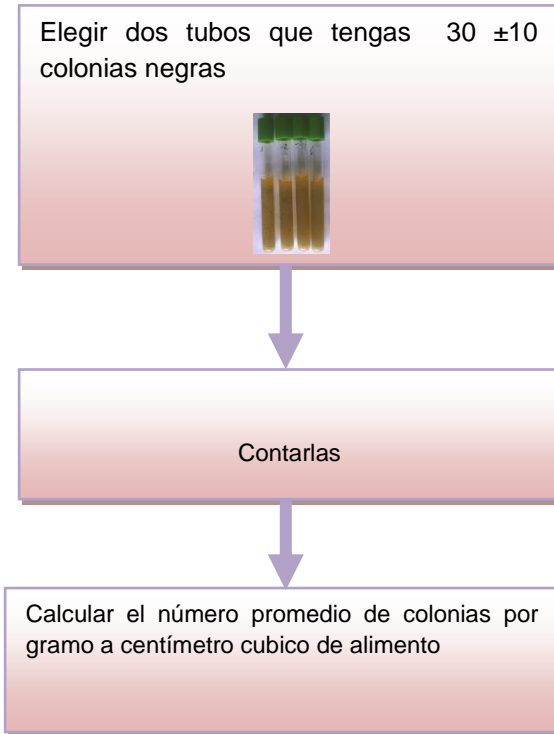
a) **Siembra**

Figura 52: Siembra para la determinación de Clostridium sulfito reductores



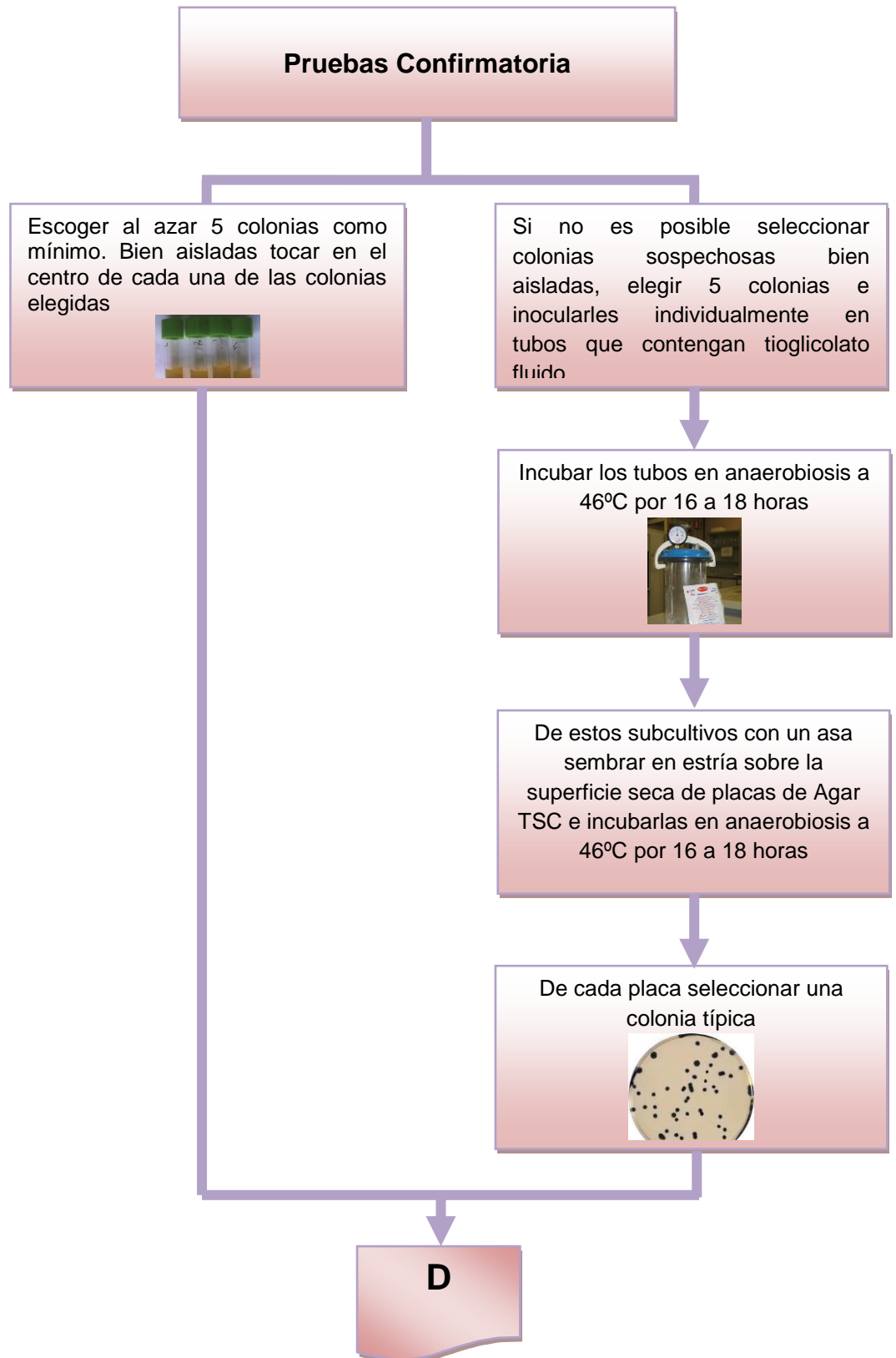
b) Recuento de colonias

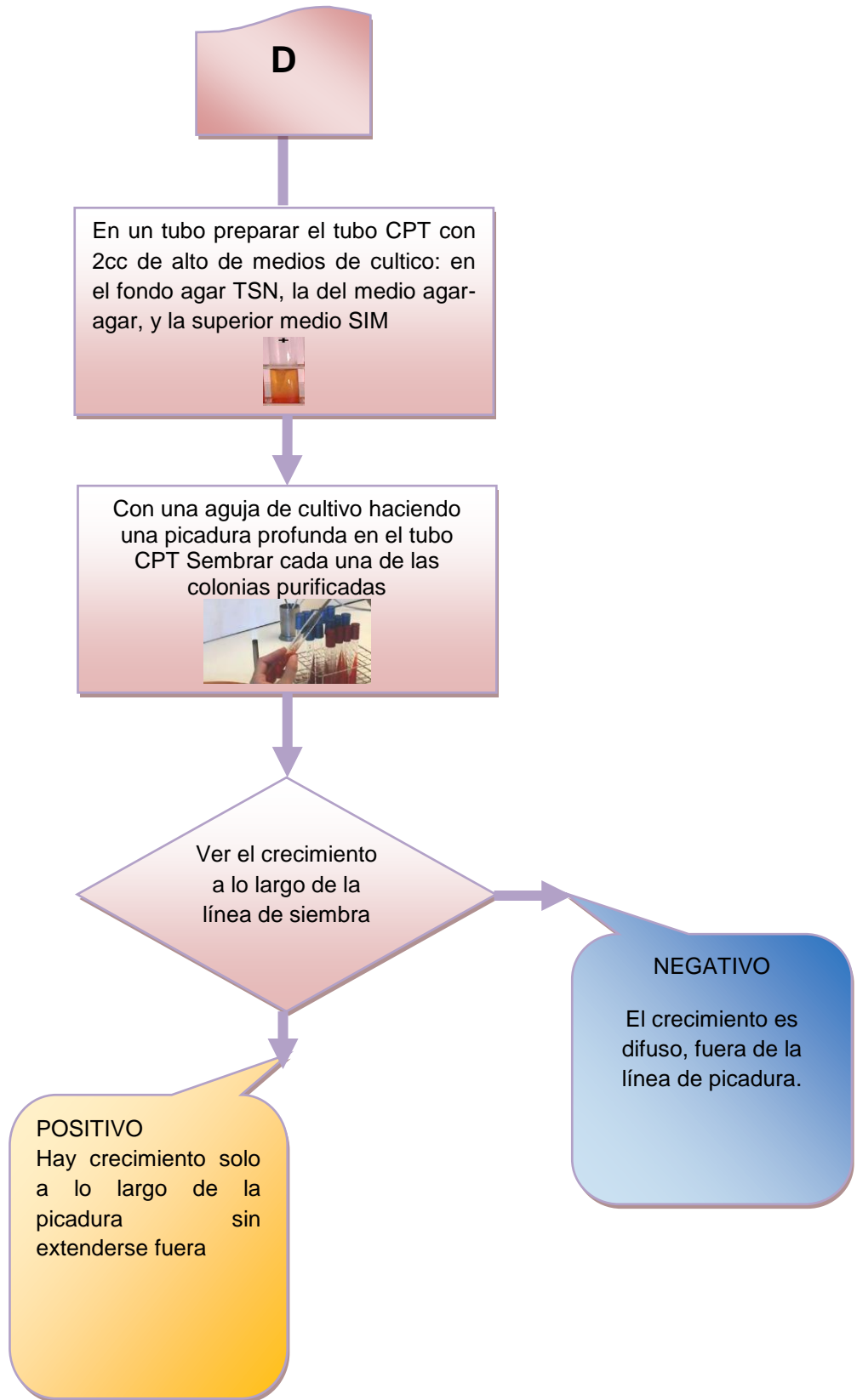
Figura 53: Recuento de colonias para la determinación de Clostridium sulfito reductores



c) Pruebas confirmatorias

Figura 54: Pruebas confirmatorias para la determinación de Clostridium sulfito-reductores





d) Interpretación: Considerar como CI. Perfringens aquellas bacterias que se producen colonias negras en agar TSN o TSC al ser incubadas a 46°C.

CÁLCULOS: “Productos diluidos: si al sembrar 1cm³ de las diluciones solo se desarrollan colonias típicas, se procede a calcular el número de unidades formadoras de colonias (UFC/g ó cm³) mediante la siguiente ecuación:

$$N = n \times f$$

En donde:

N= número de unidades formadores de colonias

n= media aritmética de las colonias contadas (obtenida mediante la suma del número de colonias contadas en las dos cajas Petri de una misma dilución, dividida para 2)

f= factor de dilución

(f=1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir);

(f=10¹ =10 cuando la dilución ha sido 1/10);

(f=10² =100 cuando la dilución ha sido 1/100); y

(f=10³ =1000 cuando la dilución ha sido 1/1000).

Productos líquidos no diluidos: cuando se siembra 1cm³ de productos líquidos no diluidos la ecuación es la siguiente:

$$N = n$$

En donde:

N= número de unidades formadores de colonias

n= media aritmética de las colonias contadas” (NTE INEN 1529-18)

4.7.2. Técnicas microbiológicas rápidas

- Recomendaciones para el manejo de las placas petrifilm

Figura 55: Manejo de placas petrifilm



Los paquetes de placas cerrados se deben almacenar a una temperatura menor o igual a 8 °C.



Las Placas Petrifilm tienen un tiempo de vida útil de 18 meses, por lo que es fundamental que se observe la fecha de caducidad en la parte superior de la placa. No se deben utilizar las placas que hayan vencido.



Las Placas Petrifilm pueden utilizarse máximo 1 mes después de abierto el paquete. Para cerrar un paquete abierto doblar el extremo del empaque y sellarlo con cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y la alteración de las placas.



Para almacenamiento prolongado de paquetes abiertos, cerrar con cinta adhesiva, colocarlos en un recipiente sellable como por ejemplo una funda con cierre y almacenarlos en congelación. Para usar las placas saque el paquete del congelador, retire el número de placas necesarias y guarde el resto en las mismas condiciones antes descritas hasta su fecha de caducidad.

j) Determinación de *Aerobios mesófilos* con petrifilm

Se utiliza Placas Petrifilm AC para la determinación de *Aerobios mesófilos* en cualquier alimento destinado al consumo humano. En esta guía se aplica a:

- Leche cruda,
- Leche pasteurizada,
- Carne molida,
- Productos cárnicos crudos,
- Productos cárnicos cocidos y
- Productos cárnicos precocidos congelados

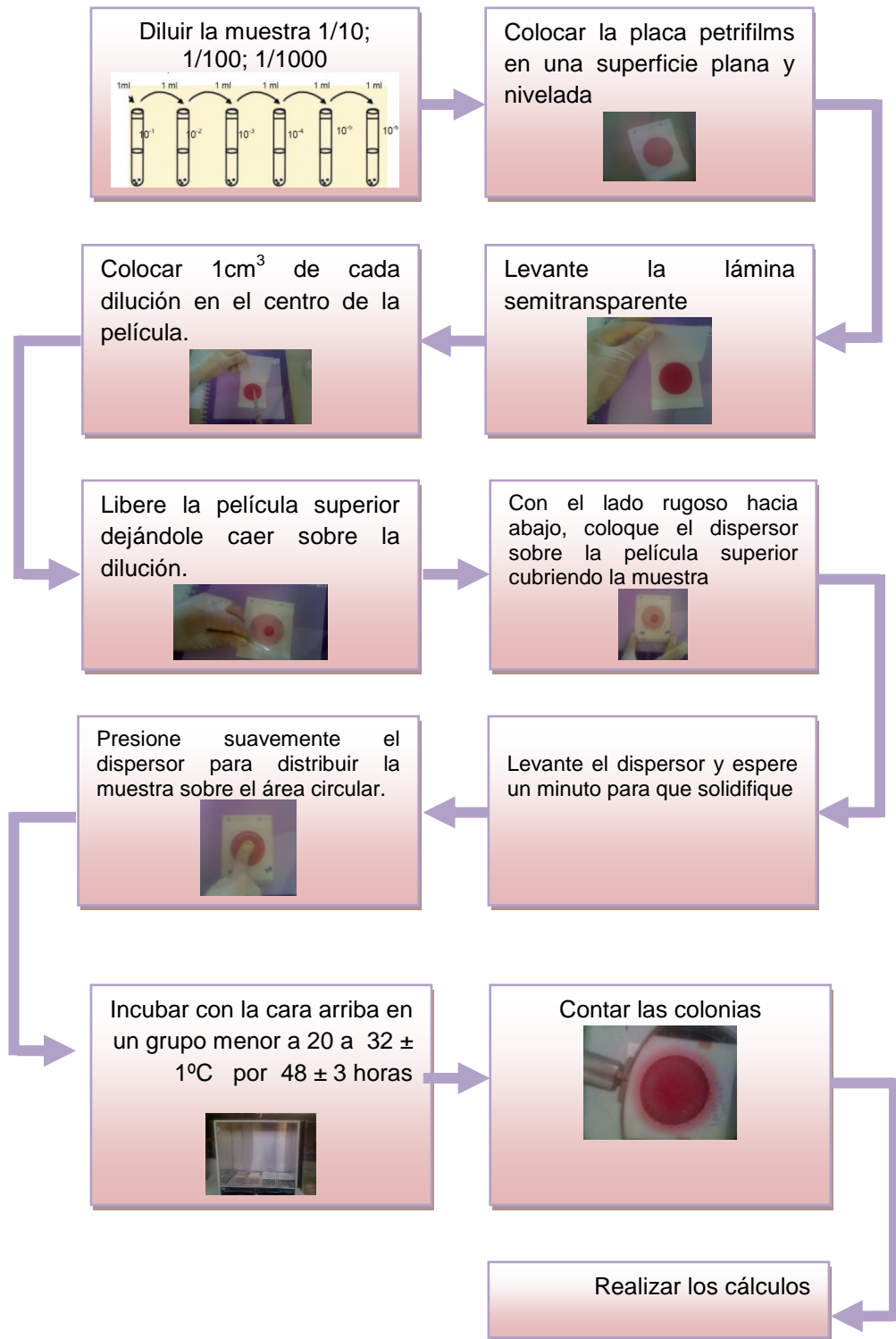
“La Placa Petrifilm para Recuento de Aerobios Totales (AC) es un medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene nutrientes del Agar Standard Methods, un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador de color rojo que facilita el recuento de las colonias.” (3M Placas Petrifilm™ para el Recuento de Aerobios)

REACTIVOS y MEDIOS DE CULTIVO:

- Placas Petrifilm para Recuento de Aerobios totales (AC)
- Agua peptona al 0,1%

PROCEDIMIENTO: La determinación debe realizarse por duplicado para cada muestra

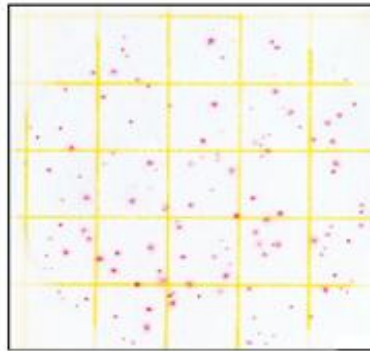
Figura 56: Procedimiento para la determinación de Aerobios mesófilos utilizando Petrifilm



CÁLCULOS: Las placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz.

El tinte indicador rojo que se encuentra en la placa colorea las colonias para su mejor identificación. Cuente todas las colonias rojas sin importar su tamaño o la intensidad del tono rojo.

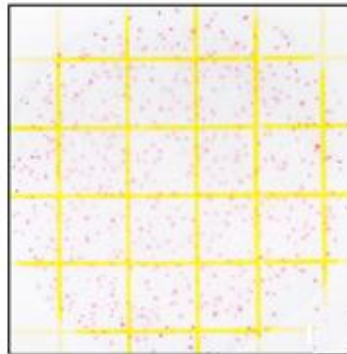
Foto 15: Aerobios Mesófilos en placas Petrifilm



Fuente: <http://www.microlabscr.com/resources/ta.pdf>

Cuando el número de colonias es mayor a 250, por su excesivo crecimiento, los conteos deben ser estimados. Determine el promedio de colonias en un cuadrado (1cm^3) y multiplíquelo por 20 para obtener el conteo total por placa. El área de la inoculación de Petrifilm es de 20cm^3 .

Foto 16: Aerobios Mesófilos en placas Petrifilm



Fuente: <http://www.microlabscr.com/resources/ta.pdf>

Una vez que se contado el número de colonias se debe remplazar los datos en la siguiente formula:

$$N = n \times f$$

En donde:

N= número de unidades formadores de colonias

n= media aritmética de las colonias contadas (obtenida mediante la suma del número de colonias contadas en las dos placas Petrifilm de una misma dilución, divide para 2)

f= factor de dilución

(f=1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir);

(f=10¹=10 cuando la dilución ha sido 1/10);

(f=10²=100 cuando la dilución ha sido 1/100); y

(f=10³=1000 cuando la dilución ha sido 1/1000).

Por ejemplo si en el conteo de se obtiene como media aritmética 146 colonias y la dilución de la muestra fue 1/100, el número real de colonias es = 146 x 100= 14600 unidades formadoras de colonias/ g o cm³.

k) Determinación de Coliformes totales y *Escherichia coli* (UFC/g ó cm³) con petrifilm

Se utiliza Placas Petrifilm EC para la determinación de *Coliformes totales* y *E. coli* en cualquier alimento destinado al consumo humano. En esta guía se aplica a:

- Leche pasteurizada
- Leches fermentadas (Yogur)
- Queso Fresco
- Carne molida
- Productos cárnicos crudos
- Productos cárnicos cocidos y
- Productos cárnicos precocidos congelados

“La Placa Petrifilm EC para Recuento de *E. coli* y Coliformes totales es un medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador que facilita el recuento de las colonias.” (3M Placas Petrifilm^{MR} para el Recuento de *E. Coli* Y Coliformes Totales) *E. coli* se lo puede identificar por colonias de color azul. Mientras que las colonias de Coliformes totales son rojas con azul.

REACTIVOS y MEDIOS DE CULTIVO:

- Placas Petrifilm para Recuento *E. coli* y Coliformes totales
- Agua peptona al 0,1%

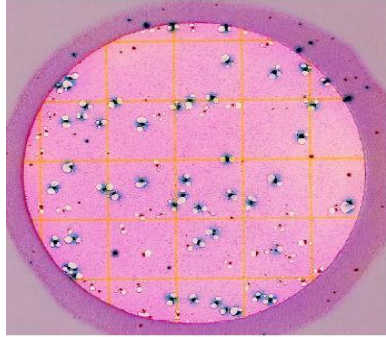
PROCEDIMIENTO: La determinación debe realizarse por duplicado para cada muestra.

El procedimiento de análisis es igual al descrito en el punto 4.7.4-j con variación en la Placa Petrifilm que se utiliza, la temperatura y tiempo de incubación que es a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 ± 2 horas.

CÁLCULOS: Las placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz.

El tinte indicador que se encuentra en la placa colorea las colonias para su mejor identificación. Cuente todas las colonias rojas (Coliformes totales) y azules (E. coli) sin importar su tamaño o la intensidad. No contar las colonias que ha crecido en la zona de espuma, únicamente las que se encuentren en el círculo de gel.

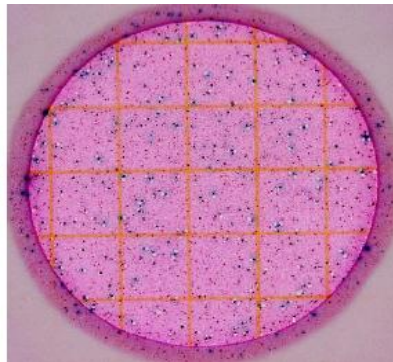
Foto 17: Coliformes y E. coli en placas Petrifilm



Fuente: <http://www.rodinsrl.com.ar/download/pec.pdf.970aa5136416b0ff011c6a3c15b46b61>

Cuando el número de colonias es mayor a 250 (como se observa en la figura), por su excesivo crecimiento, los conteos deben ser estimados. Determine el promedio de colonias en un cuadrado (1cm^2) y multiplíquelo por 20 para obtener el conteo total por placa. El área de la inoculación de Petrifilm es de 20cm^2 .

Foto 18: Coliformes y E. coli en placas Petrifilm



Fuente: <http://www.rodinsrl.com.ar/download/pec.pdf.970aa5136416b0ff011c6a3c15b46b61>

Una vez que se contado el número de colonias se debe remplazar los datos en la siguiente formula:

$$N = n \times f$$

En donde:

N= número de unidades formadores de colonias

n= media aritmética de las colonias contadas (obtenida mediante la suma del número de colonias contadas en las dos placas Petrifilm de una misma dilución, divide para 2)

f= factor de dilución

(f=1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir);

(f=10¹=10 cuando la dilución ha sido 1/10);

(f=10²=100 cuando la dilución ha sido 1/100); y

(f=10³=1000 cuando la dilución ha sido 1/1000).

I) Determinación de *Staphylococcus Aureus* con petrifilm

Se utiliza Placas Petrifilm Staph Express para el recuento de *Staphylococcus aureus* en cualquier alimento destinado al consumo humano. En esta guía se aplica a:

- Queso Fresco
- Carne molida
- Productos cárnicos crudos
- Productos cárnicos curados- madurados
- Productos cárnicos cocidos y
- Productos cárnicos precocidos congelados

“Las Placas Petrifilm Staph Express para Recuento de *Staphylococcus aureus* son un medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene un agente gelificante soluble en agua fría. El medio modificado cromogénico Baird-Parker en la placa es selectivo y diferencial para el *Staphylococcus aureus*. Las colonias *S. aureus* son de color rojo-violeta.” (3M Placas Petrifilm™ Staph Express para el Recuento de *Staphylococcus Aureus*)

REACTIVOS y MEDIOS DE CULTIVO:

- Placas Petrifilm para Recuento de *Staphylococcus aureus* (Staph Express)
- Agua peptona al 0,1%

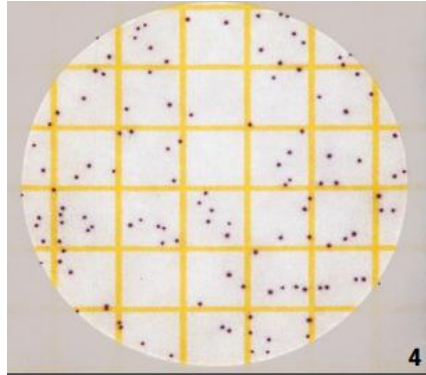
PROCEDIMIENTO: La determinación debe realizarse por duplicado para cada muestra.

El procedimiento de análisis es igual al descrito en el punto 4.7.4-j con variación en la Placa Petrifilm que se utiliza, la temperatura y tiempo de incubación que es a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 1 horas.

CÁLCULOS: Las placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz.

El tinte indicador que se encuentra en la placa colorea las colonias para su mejor identificación. Cuento todas las colonias rojo violeta sin importar su tamaño o la intensidad.

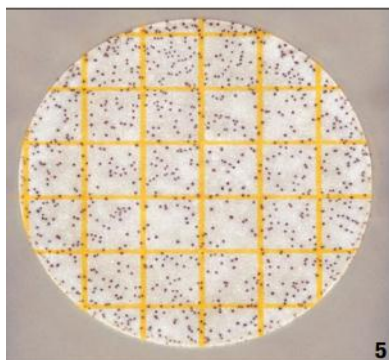
Foto 19: Staphylococcus aureus en placas Petrifilm



Fuente: http://www.distribucionesbiotecnologicas.com.mx/files/guia_petrifilm_staph_express.pdf

Cuando el número de colonias es mayor a 250 (como se observa en la figura 5), por su excesivo crecimiento, los conteos deben ser estimados. Determine el promedio de colonias en un cuadrado (1cm^3) y multiplíquelo por 20 para obtener el conteo total por placa. El área de la inoculación de Petrifilm es de 20cm^3 .

Foto 20: Staphylococcus aureus en placas Petrifilm.



Fuente: http://www.distribucionesbiotecnologicas.com.mx/files/guia_petrifilm_staph_express.pdf

Una vez que se contado el número de colonias se debe remplazar los datos en la siguiente formula:

$$N = n \times f$$

En donde:

N= número de unidades formadores de colonias

n= media aritmética de las colonias contadas (obtenida mediante la suma del número de colonias contadas en las dos placas Petrifilm de una misma dilución, dividida para 2)

f= factor de dilución

(f=1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir);

(f= 10^1 =10 cuando la dilución ha sido 1/10);

(f= 10^2 =100 cuando la dilución ha sido 1/100); y

(f= 10^3 =1000 cuando la dilución ha sido 1/1000).

m) Determinación de Mohos y levaduras con petrifilm

Se utiliza Placas Petrifilm YM para la determinación de Mohos y Levaduras en cualquier alimento destinado al consumo humano. En esta guía se aplica a:

Leches fermentadas (Yogur)

Queso Fresco

Manjar o dulce de leche

La Placa Petrifilm YM para Recuento de Mohos y Levaduras es un medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene un indicador colorante para proporcionar contraste y facilitar el recuento.

REACTIVOS y MEDIOS DE CULTIVO:

- Placas Petrifilm para Recuento Mohos y Levaduras
- Agua peptona al 0,1%

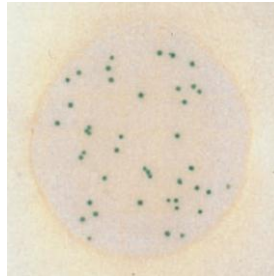
PROCEDIMIENTO: La determinación debe realizarse por duplicado para cada muestra.

El procedimiento de análisis es igual al descrito en el punto 4.7.4-j con variación en la Placa Petrifilm que se utiliza, la temperatura y tiempo de incubación que es a 22 a 25°C por 5 días.

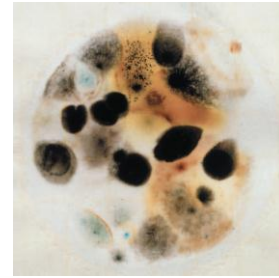
CÁLCULOS: Las placas Petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz.

Las levaduras forman colonias pequeñas, tienen bordes definidos, son de color rosa o azul verdoso. Mientras que los mohos forman colonias planas grandes, con bordes difusos, de color variable ya que pueden producir sus propios pigmentos.

Fotos 21 y 22: Mohos y Levaduras en placas Petrifilm



Levaduras



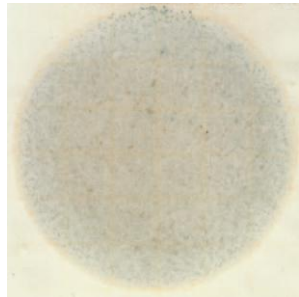
Mohos

Fuente:

http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=SSSSSu7zK1fsixtUm8mvOx_1ev7qe17zHvTSevTSeSSSSSS--&fn=YM%20Interp%20Guide_Jan06_en.pdf

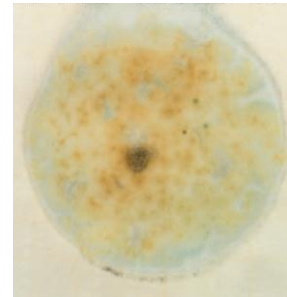
Cuando el número de colonias es mayor a 250 (como se observa en la figura), por su excesivo crecimiento, los conteos deben ser estimados. Determine el promedio de colonias en un cuadrado (1cm^3) y multiplíquelo por 20 para obtener el conteo total por placa. El área de la inoculación de Petrifilm es de 20cm^3 .

Fotos 23 y 24: Mohos y Levaduras en placas Petrifilm



Levaduras

(forman un borde azulado)



Mohos

(forman colonias atípicas)

Fuente:

http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=SSSSSu7zK1fsixtUm8mvOx_1ev7qe17zHvTSevTSeSSSSSS--&fn=YM%20Interp%20Guide_Jan06_en.pdf

Una vez que se contado el número de colonias se debe remplazar los datos en la siguiente formula:

$$N = n \times f$$

En donde:

N= número de unidades formadores de colonias

n= media aritmética de las colonias contadas (obtenida mediante la suma del número de colonias contadas en las dos placas Petrifilm de una misma dilución, divide para 2)

f= factor de dilución

(f=1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir);

(f=10¹=10 cuando la dilución ha sido 1/10);

(f=10²=100 cuando la dilución ha sido 1/100); y

(f=10³=1000 cuando la dilución ha sido 1/1000).

n) Determinación de Salmonella

Se puede utilizar la prueba rápida VIP de Biocontrol Systems para determinar salmonella en cualquier alimento destinado al consumo humano. En esta guía se aplica a:

- Queso Fresco
- Carne molida
- Productos cárnicos crudos
- Productos cárnicos curados- madurados
- Productos cárnicos cocidos y
- Productos cárnicos precocidos congelados

“Es una prueba rápida y sencilla aprobado por la AOAC que “combina la tecnología avanzada de partículas, anticuerpos altamente específicos y un formato de prueba múltiple innovador. Proporciona una mayor eficiencia en el laboratorio, la detección rápida y precisa de patógenos transmitidos por alimentos y bebidas.” (Vip Gold)

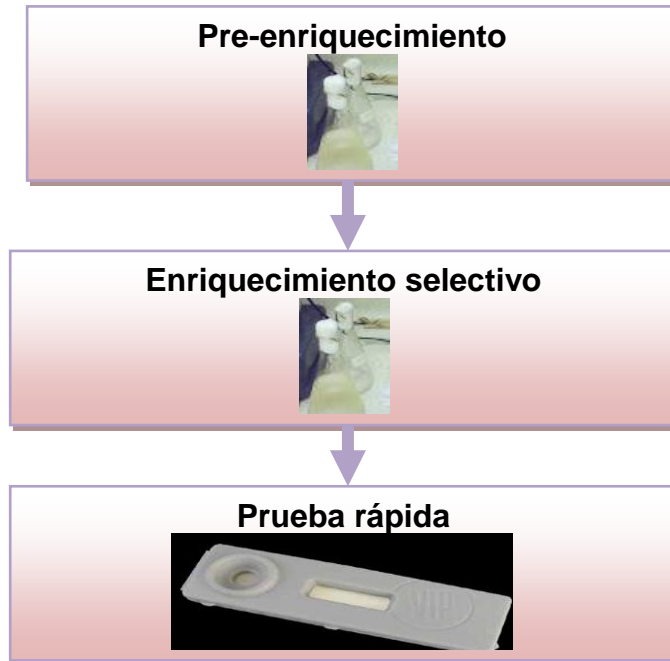
Vip de Biocontrol Systems es una prueba bioquímica que se basa en el flujo lateral. “En este formato la muestra se deposita en un pocillo y a continuación, esta difunde por capilaridad a la zona donde se encuentran los anticuerpos marcados con partículas coloreadas. En caso de correspondencia, los complejos anticuerpo-antígeno se difunden a otra zona donde está fijado un segundo anticuerpo de captura. Si los anticuerpos son específicos del antígeno, el acúmulo de partículas coloreadas retenidas en la zona de captura permite visualizar una línea coloreada.” (Martín de Santos 2010)

REACTIVOS y PRUEBAS:

- Agua peptona tamponada
- Caldo tetrionato
- Caldo selenito cristina
- Solución Yodo Yoduro
- Solución de verde brillante al 0,1%
- VIP GOLD de Biocontrol Systems para Salmonella

PROCEDIMIENTO: La determinación debe realizarse por duplicado para cada muestra

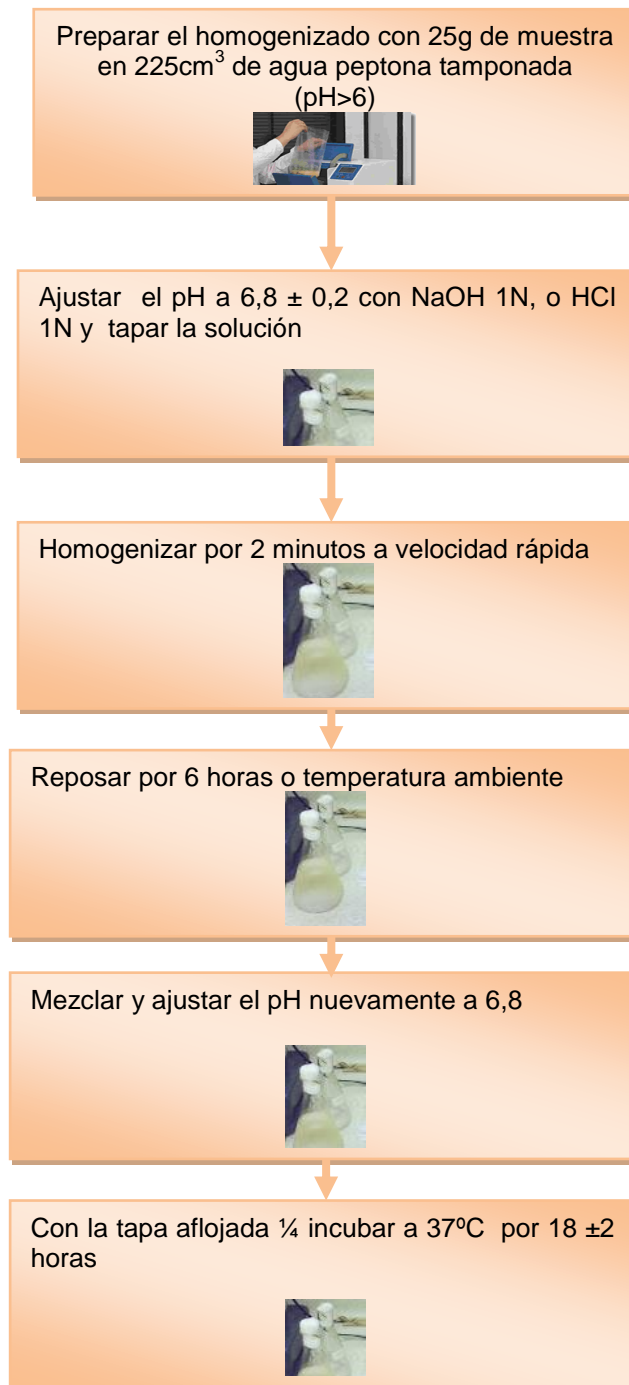
Figura 57: Procedimiento para la determinación de Salmonella utilizando la prueba rápida VIP



A continuación se describe cada etapa

a) Pre-enriquecimiento

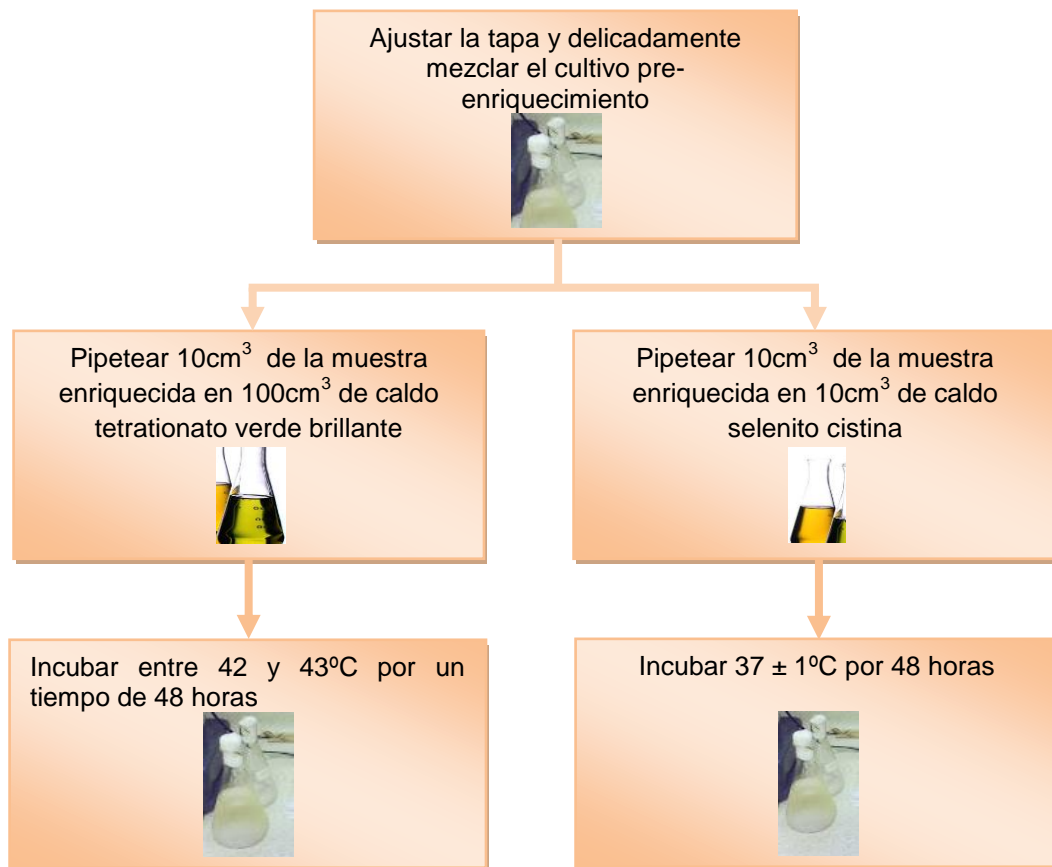
Figura 58: Pre- enriquecimiento para la determinación de Salmonella utilizando la prueba rápida VIP



b) Enriquecimiento

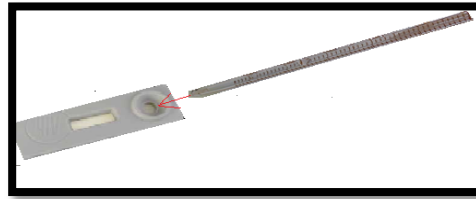
Antes de usar el caldo tetrionato, agregar $4,5 \text{ cm}^3$ de una solución yodo-yoduro y $2,25 \text{ cm}^3$ de solución de verde brillante al 0,1%. El medio una vez adicionado de yodo no debe calentarse y debe usarse el mismo día de su preparación.

Figura 59: Enriquecimiento para la determinación de Salmonella utilizando la prueba rápida VIP



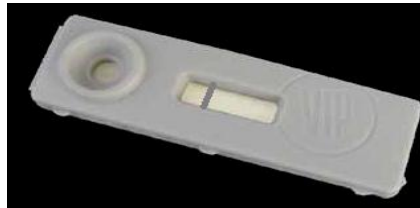
c) Prueba rápida: Luego de realizar el enriquecimiento agregar 1 cm^3 de cada caldo en las pruebas rápidas y ver la formación de las líneas en el fondo blanco.

Foto 25: Salmonella prueba rápida



RESULTADO: Si la prueba da negativo , reportar : No se aisló Salmonella en 25g de muestra examinada.

Foto 26: Salmonella prueba negativa



Caso contrario si a partir de uno o de ambos medios de enriquecimiento selectivo la prueba da positivo, reportar Se aisló Salmonella en 25g de muestra analizada.

Foto 27: Salmonella prueba positiva



o) Determinación de *Escherichia coli* O157:H7

La prueba rápida VIP de Biocontrol Systems para *E. coli* O157:H7 puede utilizarse en cualquier alimento destinado al consumo humano. En esta guía se aplica a:

- Productos cárnicos crudos y
- Productos cárnicos precocidos congelados

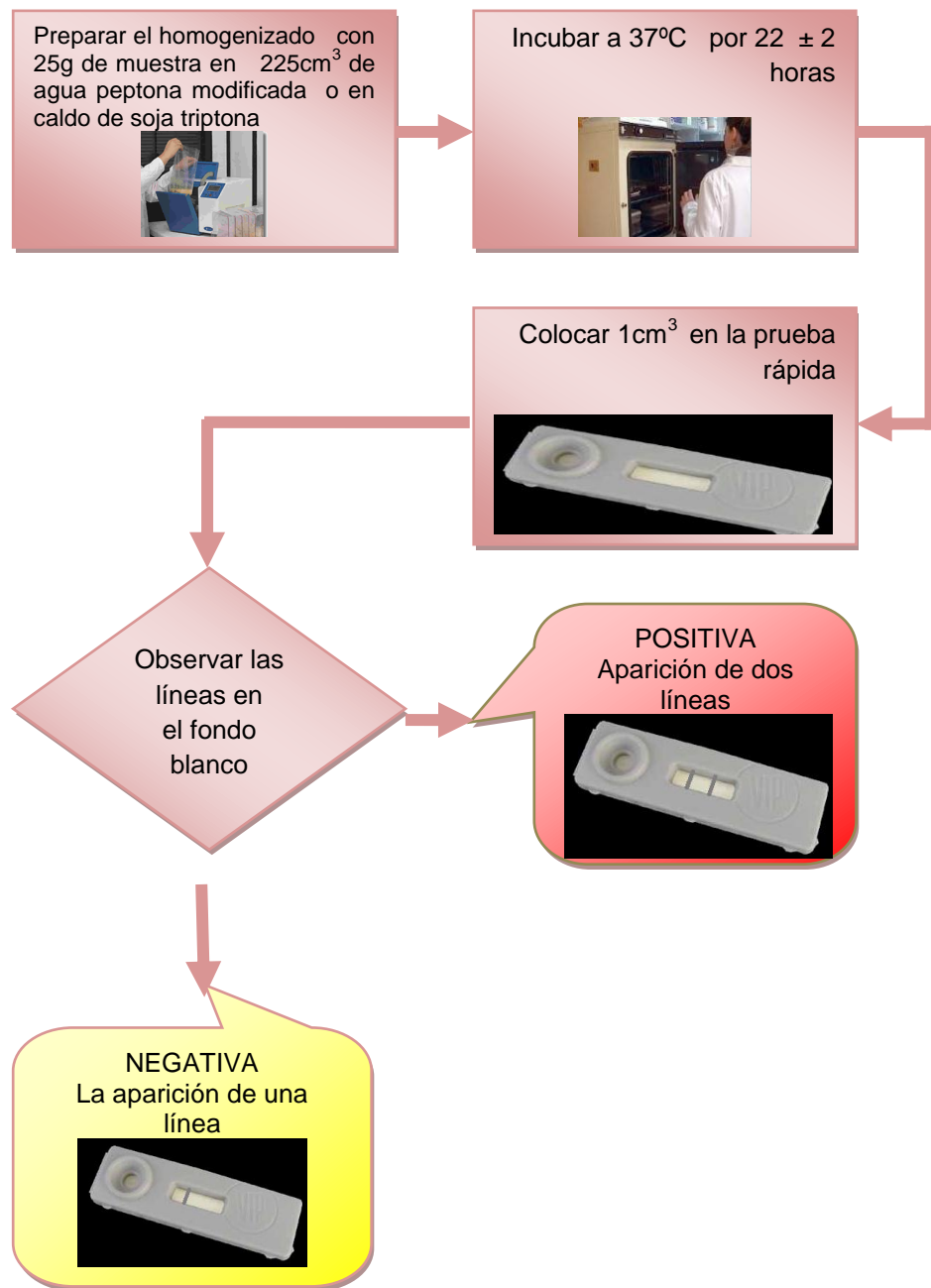
Es una prueba específica, rápida y simple aprobado por la AOAC que “combina la tecnología avanzada de partículas, anticuerpos altamente específicos y un formato de prueba múltiple innovador.” (Vip Gold) Proporciona una mayor eficiencia en el laboratorio y resultados en menos horas. Reduce la manipulación de las muestras y el trabajo, ya que solo requiere transferir la muestra en un solo paso después de su enriquecimiento.

REACTIVOS y PRUEBAS:

- Agua peptona tamponada modificada (contiene cefixima, vancomicina y cefsulodina)
- Caldo de soja triptona modificado (contiene buffer de fosfato, sales biliares y novobiocina)
- VIP GOLD de Biocontrol Systems para EHEC

PROCEDIMIENTO: La determinación debe realizarse por duplicado para cada muestra.

Figura 60: Procedimiento para la determinación de E-coli O157H7 utilizando la prueba rápida VIP



RESULTADO: Al ser una prueba cualitativa se reportará la Ausencia o la Presencia de la bacteria patógena en la muestra analizada.

CAPÍTULO VI

GUÍA DE MUESTREO Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO PARA AMBIENTES Y SUPERFICIES

6.1. Introducción

En el procesamiento de los alimentos es necesario evitar la contaminación de las materias primas, insumos, material de empaque y productos terminados con microorganismos, tanto patógenos como alterantes, provenientes del ambiente, equipos, utensilios, superficies y del personal manipulador. Por esta razón se debe realizar controles microbiológicos periódicos poniendo en práctica las siguientes recomendaciones: conocer cuáles son los requisitos microbiológicos, realizar el muestreo, preparar la muestra para el ensayo, seleccionar la técnica de análisis, llevarla a cabo e interpretar los resultados obtenidos.

6.2. Requisitos microbiológicos de superficies de contacto

No existe en el país una norma que especifique los requisitos que deben cumplir las superficies que están en contacto con alimentos y bebidas por lo que se ha tomado como referencia la Norma Peruana 346583 (Guía técnica para el análisis microbiológico de superficies en contacto con alimentos y bebidas). Esta guía establece requisitos microbiológicos tanto para superficies inertes como para superficies vivas.

6.2.1. Requisitos microbiológicos de superficies inertes

Se entiende por superficies inertes a todas las partes externas y/o internas de los equipos, utensilios y superficies que están en contacto con los alimentos. La norma especifica dos requisitos microbiológicos para el análisis de superficies inertes, que están en función del método de muestreo que se emplee y se los puede apreciar en las siguientes tablas:

Tabla 15: Requisitos microbiológicos para superficies inertes- Muestreo mediante método del hisopo

SUERFICIES INERTES				
METODO HISOPO	Superficie Regular		Superficie Irregular	
ENSAYO	Límite de Detección del Método	Limite Permisible (*)	Límite de Detección del Método	Limite Permisible (*)
Coliformes totales	< 0,1 ufc/cm ²	< 1 ufc/cm ²	< 10 ufc/ superficie muestreada	< 10 ufc/ superficie muestreada
Patógeno	Ausencia / superficie muestreada en cm ² (**)	Ausencia / superficie muestreada en cm ² (**)	Ausencia / superficie muestreada en cm ² (**)	Ausencia / superficie muestreada en cm ² (**)
(*) En las operaciones analíticas, Estos valores con indicadores de ausencia. (**) Indicar el área muestreada, la cual debe ser mayor o igual a 100cm ²				

Fuente: Norma Peruana 346583

Tabla 16: Requisitos microbiológicos para superficies inertes- Muestreo mediante método de la esponja

SUPERFICIES INERTES				
MÉTODO ESPONJA	Superficie Regular		Superficies Irregular	
ENSAYO	Límite de Detección del Método	Limite Permisible (*)	Límite de Detección del Método	Limite Permisible (*)
Coliformes totales	< 1 ufc/cm ²	< 1 ufc/cm ²	< 25 ufc/superficie muestreada (**)	< 25 ufc/superficie muestreada (**)
Patógeno	Ausencia / superficie muestreada en cm ² (***)	Ausencia / superficie muestreada en cm ² (***)	Ausencia / superficie muestreada en cm ²	Ausencia / superficie muestreada en cm ²
(*) En las operaciones analíticas, estos valores con indicadores de ausencia. (**) Para 4 utensilios. (***) Indicar el área muestreada, la cual debe ser mayor o igual a 100cm ²				

Fuente: Norma Peruana 346583

6.2.2.Requisitos microbiológicos de superficies vivas, recipientes y objetos pequeños

Foto 28: Manos

Se denomina superficies vivas a las partes del cuerpo humano que entran en contacto con los alimentos así como con los equipos y utensilios.



La norma específica dos requisitos microbiológicos para el análisis de superficies cuyo muestreo se realiza mediante el método del enjuague y se los puede apreciar en la siguiente tabla:

Tabla 17: Requisitos microbiológicos para superficies vivas, objetos pequeños y recipientes- Muestreo mediante método de enjuague

SUERFICIES				
MÉTODO ENJUAGUE	Superficie Regular		Superficies Irregular	
ENSAYO	Límite de Detección del Método	Limite Permisible (*)	Límite de Detección del Método	Limite Permisible (*)
Coliformes totales	< 100 ufc/manos	< 100 ufc/manos	< 25 ufc/superficie muestreada (**)	< 25 ufc/superficie muestreada (**)
Staphylococcus aureus	< 100 ufc/manos	< 100 ufc/manos	--	--
Patógeno	Ausencia / manos	Ausencia / manos	Ausencia / superficie muestreada	Ausencia / superficie muestreada
(*) En las operaciones analíticas, estos valores con indicadores de ausencia. (**) Para 4 utensilios.				

Fuente: Norma Peruana 346583

6.3. Requisitos microbiológicos de ambientes

No existe en el país una norma que especifique los requisitos que deben cumplir los ambientes de las fabricas procesadoras de alimentos por lo que se ha tomado como referencia La norma de Control microbiológico del aire de Norpacific. S.A. la cual indica que controles realizar en la industria alimentaria pero no establece límites de aceptación, como se puede apreciar en la siguiente tabla.

Tabla 18: Control microbiológico del aire.

PRINCIPALES APLICACIONES DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL AIRE		
SECTOR DE ACTIVIDAD	PARAMETRO A CONTROLAR	MICROORGANISMOS BUSCADOS
INDUSTRIA ALIMENTICIA	HIGIENE DE LA PRODUCCIÓN (en actividad)	FLORA AEROBIOA MESOFILA FLORA FUNGICA GÉRMENES ESPECÍFICOS: MUCOR- PENICILLIUM SPP.- APERGILLUS
	MANTENIMIENTO DE HIGIENE (sin actividad)	ENTEROCOCOS STAFILOCOCOS
BODEGAS INDUSTRIALES	CONTROL DESPUES DE LA DESINFECCIÓN	FLORA AEROBIOA MESOFILA FLORA FUNGICA APERGILLUS sp. ENTEROCOCOS STAFILOCOCOS

Fuente: Norpacific. S.A.

6.4. Muestreo

El método de muestreo debe estar en función de las características de la superficie o ambiente a muestrear. Este tiene que ser realizado por personal autorizado que tenga la formación apropiada para llevarlo a cabo, el mismo que tendrá que tomar las medidas adecuadas para evitar la contaminación durante la toma y envío de las muestras.

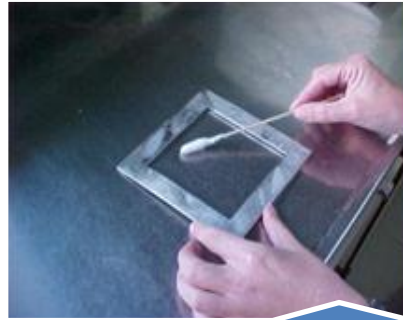
Utilizar material estéril para la toma y envío de la muestra, el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y la entrega debe ser el menor posible. En cada muestra tomada colocar una tarjeta que incluya un número de identificación y la fecha de muestreo y a la muestra enviada al laboratorio adjuntar un acta de muestreo, la cual debe contener los siguientes datos:

- Lugar, fecha y hora de realización del muestreo.
- Número de identificación de la muestra
- Área o Superficie muestreada
- Método de muestreo empleado
- Numero de muestras tomadas
- Observaciones
- Nombres, firmas y direcciones de las partes interesadas

6.4.1.Muestreo de superficies

El muestreo en superficies se realiza mediante tres métodos que se describen en la siguiente figura.

Figura 61: Muestreo de superficies



http://www.slideshare.net/figerand/control-superficies-29?src=related_normal&rel=3514839

Método del Hisopo

Se utiliza en superficies inertes como por ejemplo mesas de trabajo, utensilios, recipientes, equipos, pisos, paredes, etc.

<http://biosolutions.com.co/orod5.html>



Método de la Esponja

Se emplea principalmente para muestrear superficies de gran tamaño.



<http://platea.pntic.mec.es/~jpascual/globe/USO%20DE%20INSTRUMENTOS/Usodweb.htm>

Método del Enjuague

Se aplica para el muestreo de manos, objetos pequeños y superficies interiores de envases, empaques, botellas, etc.

Los procedimientos de muestreo de cada uno de estos métodos se presentan a continuación:

Figura 62: Procedimiento de muestreo con el método del hisopo



Figura 63: Procedimiento de muestreo con el método de la esponja

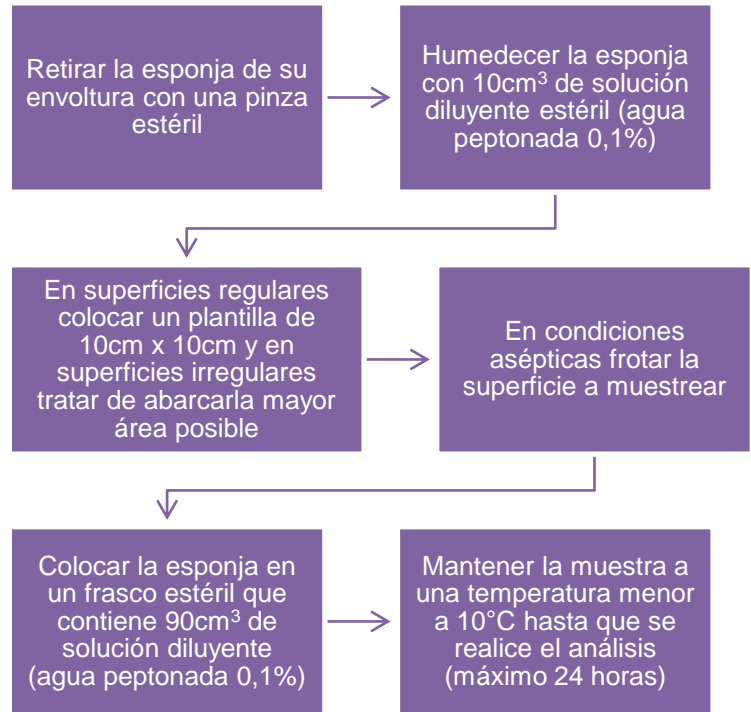


Figura 64: Procedimiento de muestreo con el método del enjuague para recipientes

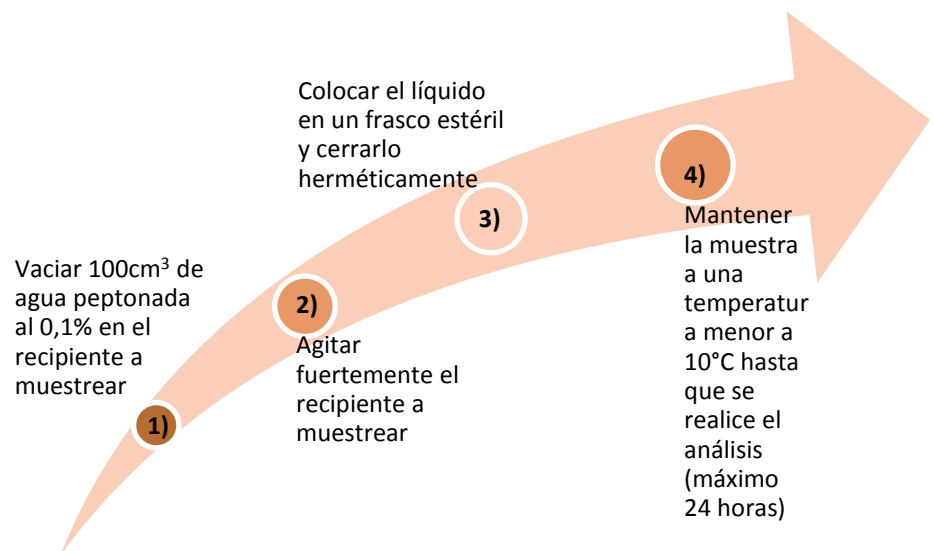


Figura 65: Procedimiento de muestreo con el método del enjuague para manos

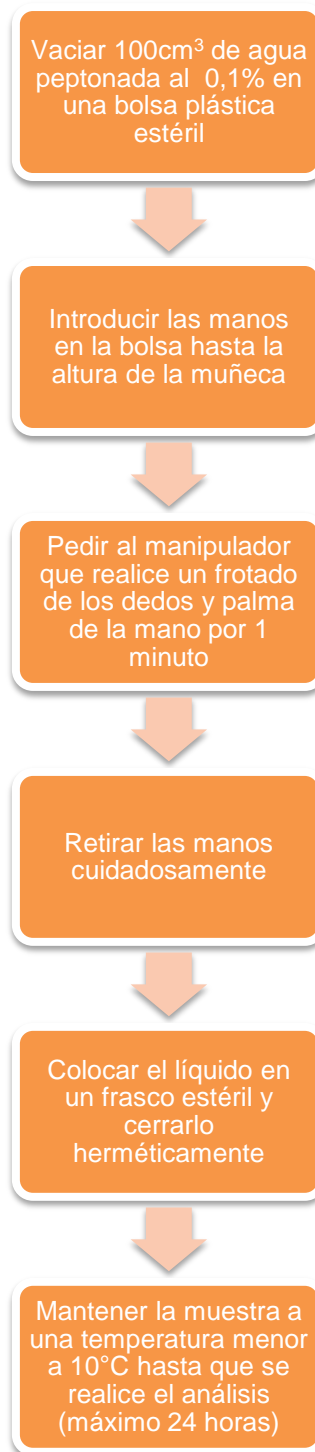
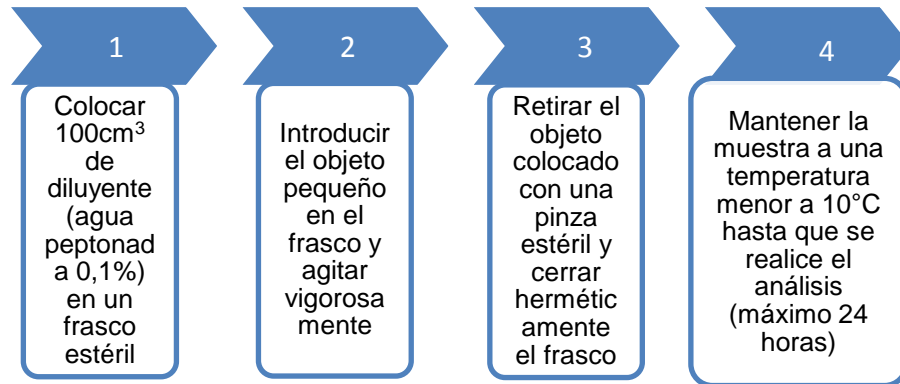
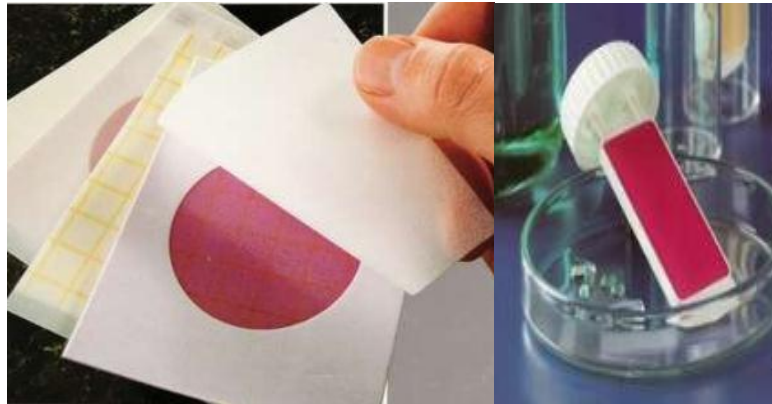


Figura 66: Procedimiento de muestreo con el método del enjuague para objetos pequeños



Además de los procedimientos antes descritos el muestreo de superficies puede ser realizado mediante contacto o impresión utilizando placas Petrifilm o Paletas de agar, las cuales después del muestreo deben ser incubadas inmediatamente.

Foto 29: Paleta de agar y Placas Petrifilm



Fuente: http://www.slideshare.net/tigerland/control-superficies-29?src=related_normal&rel=3514839

Las paletas de agar vienen preparadas y con el medio de cultivo deseado por lo que su uso es directo sobre la superficie, el procedimiento es el siguiente:

Figura 67: Procedimiento de muestreo con Paletas de agar para analisis de superficies



http://www.slideshare.net/tigerland/control-superficies-29?src=related_normal&rel=3514839

El muestreo con placas Petrifilm es diferente para manos y superficies, estos de los puede apreciar en las siguientes figuras.

Figura 68: Procedimiento de muestreo con placas Petrifilm para análisis de manos

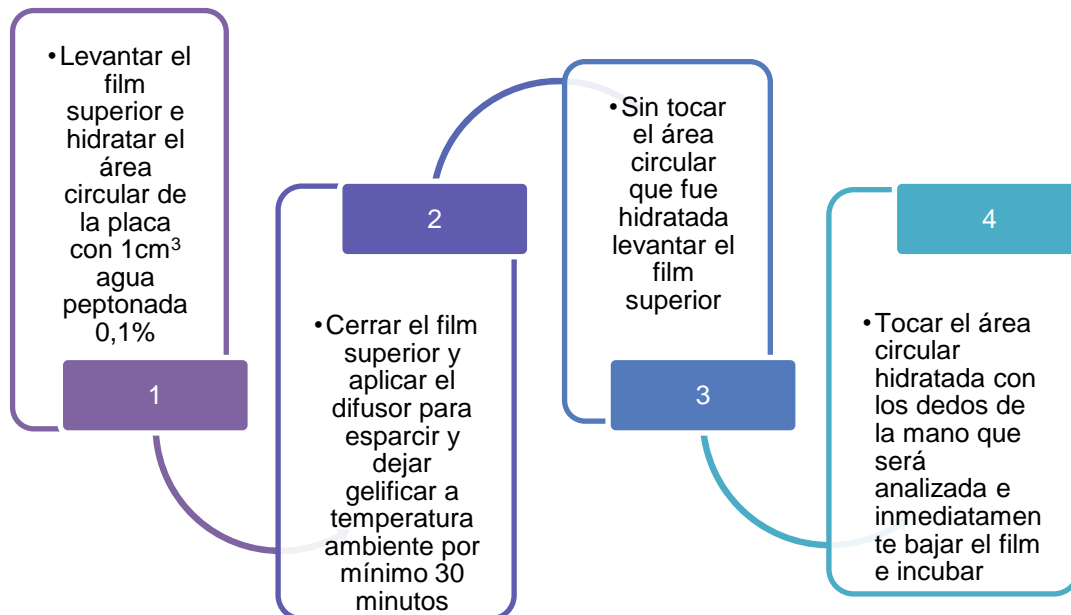
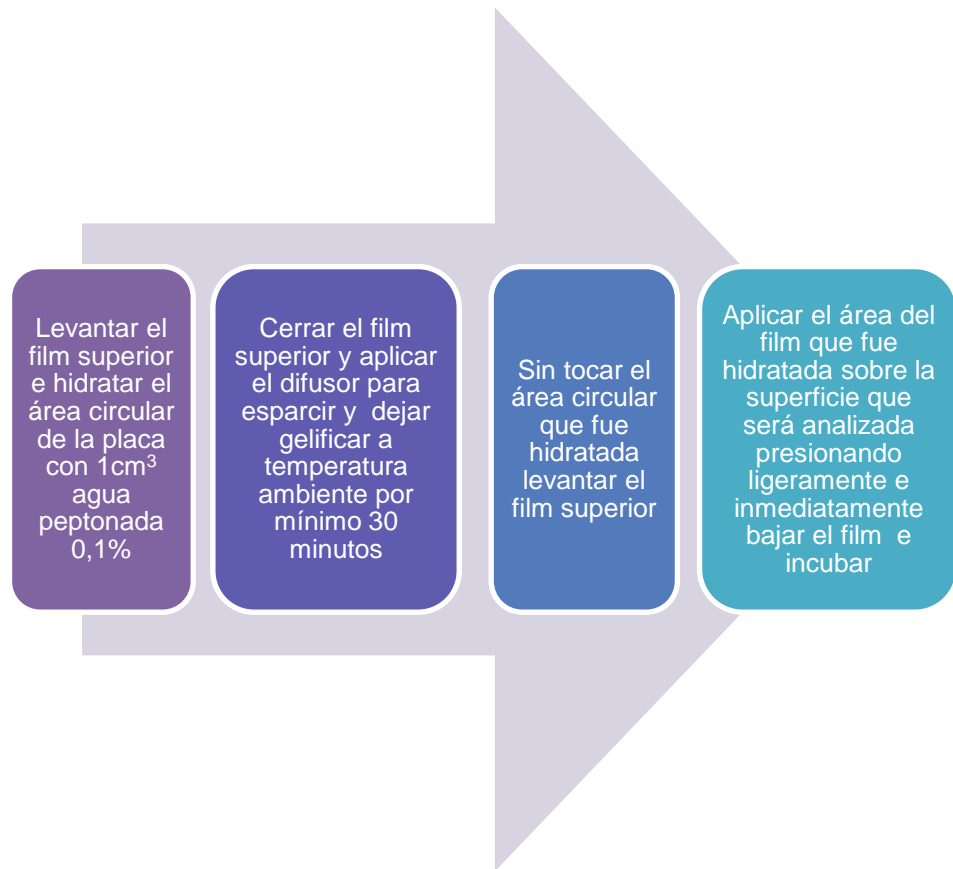


Figura 69: Procedimiento de muestreo con placas Petrifilm para análisis de superficies



6.4.2. Muestreo de ambientes

Para escoger los lugares donde se tomaran las muestras de aire, es importante que se conozca bien la ubicación de la planta, cual es el recorrido del viento dentro de la planta es decir donde entra y por donde sale, y se identifiquen los puntos estratégicos en donde es indispensable determinar la calidad microbiológica del mismo.

El muestreo en ambientes se realiza mediante dos procedimientos que se describe a continuación dependiendo de la técnica de análisis que se va a utilizar:

Figura 70: Procedimiento de muestreo de ambientes con Cajas petri

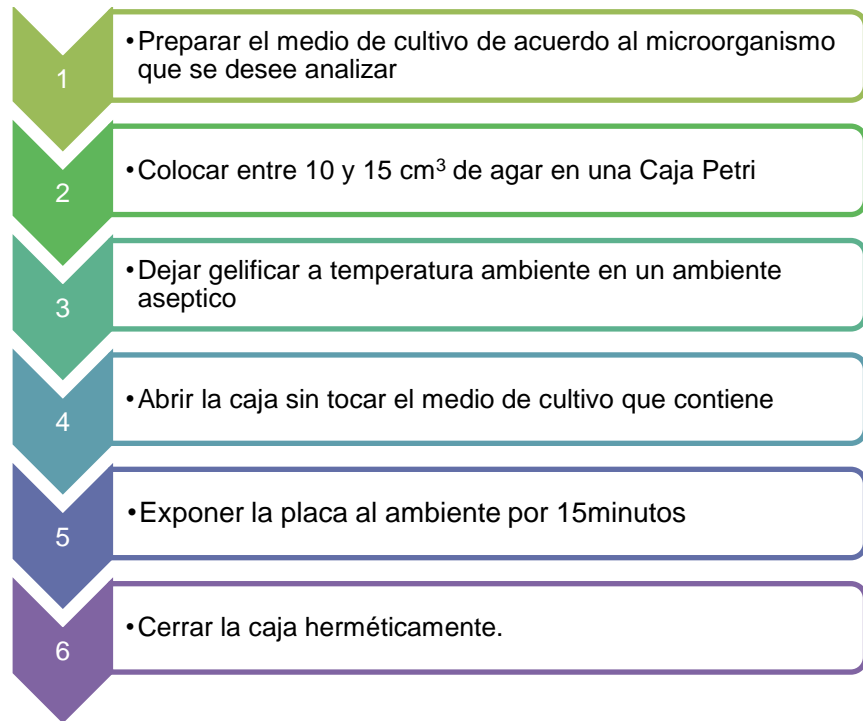
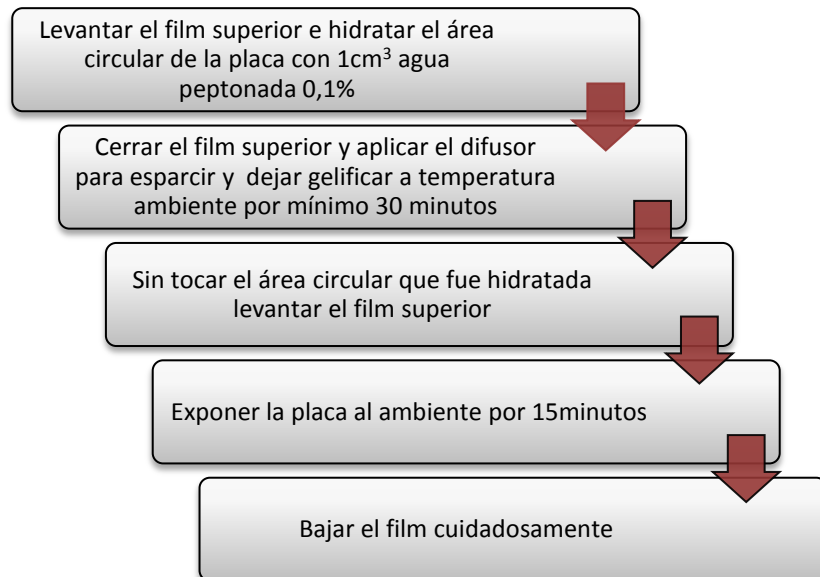


Figura 71: Procedimiento de muestreo de ambientes con placas Petrifilm



6.5. Técnicas tradicionales y rápidas de análisis microbiológico de superficies

Luego del muestreo de las superficies se deben realizar los siguientes análisis:

a) *Aerobios mesófilos*

Estas técnicas podemos observarlas en el capítulo anterior (4.7.1-a y 4.7.2-j)

b) *Coliformes totales*

Las técnicas se realizan como se ha explicado en el capítulo anterior (4. 7.1-d y 4.7.2-k)

c) *Staphylococcus aureus*

La determinación de *S. aureus* mediante las técnicas se encuentran citadas en el capítulo anterior (4. 7.1-f y 4.7.2-l).

d) *Mohos y levaduras*

Estas técnicas se encuentran especificadas en el capítulo anterior (4.7.1-g y 4.7.2-m)

e) *Salmonella*

La determinación de *Salmonella* se debe realizar mediante las técnicas se encuentran citadas en el capítulo anterior (4.7.1-h y 4.7.2-n).

6.6. Técnicas tradicionales y rápidas de análisis microbiológico de ambientes

De acuerdo a los requisitos de la Norma de control microbiológico del aire se debe analizar *Aerobios mesófilos*, *Staphylococcus aureus*, *Mohos* y *Levaduras* en ambientes. En comparación con las técnicas de análisis superficies estas varían en la obtención de la muestra, ya que esta es tomada directamente en los medios de cultivo o Petrifilm, y únicamente se tiene que incubar las muestras a las temperaturas adecuadas.

CAPÍTULO VI

COSTOS PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE UN LABORATORIO BÁSICO EN CUANTO A EQUIPOS Y MATERIALES SE REFIERE.

4.1. Introducción

Para llevar a cabo un control microbiológico de los alimentos es necesario disponer de un laboratorio para la manipulación de las muestras, preparación de estas para el ensayo y para realizar el análisis. Este laboratorio debe contar con una dotación mínima de equipos como por ejemplo, autoclave, balanzas, incubadora, pH metro, etc.; además debe disponer de medios de cultivo, reactivos y materiales de laboratorio para llevar a cabo las técnicas de muestreo y análisis. Por esta razón se ha creído conveniente proporcionar a los usuarios de esta guía información acerca de los costos aproximados que tendría la implementación de un laboratorio básico de microbiología.

4.2. Cotizaciones

EQUIPOS	COSTO
Baño de agua con regulador de temperatura	\$ 116,18
Contador de colonias.	\$ 95,89
Balanza de capacidad no superior a 2500g y de 0,1g de sensibilidad.	\$ 130,58
Incubador regulable (25° a 70°C).	\$ 116,18
Autoclave.	\$ 1.226,00
Refrigeradora pequeña	\$ 340,00
pH-metro.	\$ 75,99
Microscopio	\$ 1500,00
Estufa de secado, con regulador de temperatura.	\$ 1.350,00
Molino de carne para laboratorio	\$ 165,00
Licuada de 8000 a 45000 rpm, con vaso de metal o vidrio autoclavables.	\$ 105,99
Mechero Bunsen	\$ 15,00
Microondas	\$ 145,00
TOTAL:	\$ 5275,82

MATERIALES	COSTO
Cajas Petri (paquete de 25 unidades)	\$ 35,50
Erlenmeyer de 100cm ³ ,	\$ 3,25
Erlenmeyer de 250cm ³ ,	\$ 5,60
Erlenmeyer de 500cm ³	\$ 7,90
Erlenmeyer de 1000cm ³	\$ 12,30
Pipetas serológica de punta ancha de 1cm ³	\$ 5,30
Pipetas serológica de punta ancha de 10cm ³	\$ 6,50
Pipetas Pasteur.	\$ 8,00
Gradillas para tubos de ensayo	\$ 5,00
Tubos de ensayos estériles con tapones de goma.	\$ 0,75
Tubos Durhan de 50 x 6 mm	\$ 1,20
Asa de inoculación (3 unidades)	\$ 4,30
Aguja de inoculación, hecha preferiblemente de alambre de micrón o de platino-iridio.	\$ 0,99
Caja de placas porta objetos	\$ 45,00
Varillas de vidrio en forma de L.	\$ 4,50
Pinzas	\$ 6,00
Espátulas	\$ 7,80
Tijeras	\$ 1,00
Agar-Agar	\$ 25,00
Agar verde brillante	\$ 27,60
Petrifilm (paquete de 25 unidades) Coliformes totales	\$ 25,50
Petrifilm (paquete de 25 unidades) E. coli	\$ 49,00
Petrifilm (paquete de 25 unidades) S. aureus	\$ 64,00
Jarras anaeróbicas o cualquier equipo adecuado para el cultivo anaerobio.	\$ 125,00
Frascos de vidrio para muestreo con tapa rosca, autoclavables	\$ 25,00
TOTAL:	\$ 502,00

CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo nos permite establecer las siguientes conclusiones:

- En el análisis microbiológico de alimentos es de suma importancia realizar un adecuado muestreo, transporte, conservación y preparación de la muestra, ya que en gran medida la confiabilidad de resultados dependerán de cómo se hayan llevado a cabo estos; por lo que es necesario que el personal encargado del muestreo conozca la naturaleza de la muestra, forma de conservación de la misma y la cantidad de unidades de muestreo que deben obtener para que la muestra sea representativa del lote de producto.
- Los métodos microbiológicos estándares o tradicionales, son empleados por numerosos laboratorios a nivel mundial para la detección de microorganismos de forma precisa y para la confirmación de positivos que no pueden ser realizados por las pruebas tamiz o pruebas rápidas. Sin embargo estos se caracterizan por ser laboriosos, emplear grandes volúmenes de diluyentes, reactivos y medios de cultivo y por requerir un tiempo considerable para la obtención de los resultados.
- Las técnicas rápidas de microbiología permiten el aislamiento, identificación y recuento de microorganismos con precisión, de manera sencilla y en corto tiempo, lo cual facilita analizar un número elevado de muestras, liberar lotes de producción a tiempo y tomar decisiones inmediatas. Pero la aplicación de estas técnicas rápidas no excluye las etapas de pre-enriquecimiento y enriquecimiento selectivo, ni la confirmación de resultados positivos por las técnicas estándares.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda que la preparación de los diluyentes, medios de cultivo y reactivos se realice siguiendo las instrucciones y procedimientos especificados en la Norma Técnica Ecuatoriana 1529-1:99
- Se recomienda que las microempresas utilicen las técnicas rápidas que además de las ventajas antes descritas están reconocidas y aprobadas por organismos competentes a nivel nacional e internacional como el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” (INHMT), La AOAC Internacional, El Manual de Análisis Bacteriológico de la FDA de los Estados Unidos (BAM) o La Organización Nacional Francesa de Estandarización (AFNOR), entre otras.

BIBLIOGRAFIA

Referencias bibliográficas

ADAMS, M.R. y MOSS, M.O. (2005). Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. Pág. 1-54, 130-136, 141-149, 211-233, 241-264, 381-419.

ESESARTE GOMEZ, Esteban. Higiene de los alimentos y bebidas. (2002). 5ta Edición. Editorial Trillas S.A de C.V. México. Pág. 19-94

FORSYTHE S.J. y HAYES P.R. (2005). Higiene de los alimentos, Microbiología y HACCP. 2da Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España. Pág. 165-210

ICMSF. (2004). Microorganismos de los alimentos 7. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España. Pág.15-19, 125-145, 229-239, 317-334.

NTE INEN 0004: 1984 Leche y Productos lácteos. Muestreo. Pág.1-7

NTE INEN 0009:2008 Leche Cruda. Requisitos. Pág. 2

NTE INEN 0010:2009 Leche Pasteurizada. Requisitos. Pág. 3

NTE INEN 0018:1973 Leche Ensayo de Reductasa. Pág.1-2

NTE INEN 0700:2011 Manjar o Dulce de leche. Requisitos. Pág. 2

NTE INEN 0776: 1985 Carne y Productos cárnicos. Muestreo. Pág. 1-7

NTE INEN 1338:2010 Carne y Productos Cárnicos. Productos Cárnicos Crudos, Productos Cárnicos Curados- Madurados y Productos Cárnicos Precocidos- Cocidos. Requisitos. Pág.7-8

NTE INEN 1346:2010 Carne y Productos Cárnicos. Carne Molida. Requisitos. Pág. 2

NTE INEN 1528:1987 Queso Fresco. Requisitos. Pág. 2

NTE INEN 1529-2: 1999 Control microbiológico de los alimentos, toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico Pág. 1-17

NTE INEN 1529-5:2006 Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos *Aerobios mesófilos*. REP. Pág. 1-5

NTE INEN 1529-6:1990 Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos Coliformes por la técnica del número más probable. Pág. 1-6

NTE INEN 1529-7:1990 Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos Coliformes por la técnica de recuento de colonias. Pág.1-4

NTE INEN 1529-8:1990 Control microbiológico de los alimentos. Determinación de *Coliformes fecales* y *E. coli*. Pág.1-6

NTE INEN 1529-10:1998 Control microbiológico de los alimentos. Mohos y Levaduras viables. Recuentos en placa por siembra en profundidad. Pág. 1-5

NTE INEN 1529-14:1998 Control microbiológico de los alimentos. *Staphylococcus aureus*. Recuento en placa de siembra por extensión en superficie. Pág. 1-9

NTE INEN 1529-15:2009 Control microbiológico de los alimentos. Salmonella. Método de detección. Pág. 1- 17

NTE INEN 1529-18: 1998 Control microbiológico de los alimentos. *Clostridium Perfringens*. Recuento en tubo por siembra en masa. Pág. 1-6

NTE INEN 2395:2011 Leches Fermentadas. Requisitos. Pág. 4

PASCUAL ANDERSON, Rosario, CALDERÓN y PASCUAL, Vicente. (2000). Microbiología Alimentaria - Metodología analítica para los alimentos y bebidas. 2da Edición. Edita Díaz Santos S.A. Madrid España. Pág. 3-32, 41-62, 73-83, 149-155, 219-235, 281-301.

Referencias Electrónicas

ANDÚJAR, Gustavo, PÉREZ, Dany y VENEGAS, Octavio. (2009). Química y bioquímica de la carne y los productos cárnicos. Editorial: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Cuba. Pág. 18-49
<http://site.ebrary.com/lib/uasuaysp/docDetail.action?docID=10317000&p00=Qu%C3%ADmica+y+bioqu%C3%ADmica+de+la+carne+y+los+productos+c%C3%A1rnicos>
Consulta: Enero 2012

CABALLERO TORRES, Ángel E. (2008). Temas de Higiene de los alimentos. Editorial Ciencias Médicas. La Habana Cuba. Pág. 1-15, 20-27, 29-40, 43-53
<http://www.inha.sld.cu/Documentos/libro.pdf>
Consulta: Enero 2012

CAC/GL 50-2004 Directrices generales sobre muestreo. Pág.5-72
www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=10141
Consulta: Febrero 2012

CORUJO FERNÁNDEZ, Alfredo. Reglamentación y Métodos de muestreo de Canales en Mataderos.

<http://www.slideshare.net/albeco/mataderos>

Consulta: Marzo 2012

DECRETO PRESIDENCIAL Nº 3253 DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR. (2002).

Reglamento de buenas prácticas de manufactura para alimentos procesados. Pág.1-21

<http://www.minag.gob.pe/portal/download/pdf/direccionesyoficinas/dgca/normatividad-lacteos/Ecuador/Reglamento%20de%20Buenas%20Pr%20cticas%20para%20Alimentos%20Procesados.pdf>

Consulta: Diciembre 2011

DÍAZ TORRES, Raúl y PRATS LÓPEZ, Deborah. (2009). Conservación de los alimentos.

Editorial: Editorial Félix Varela. Cuba. Pág. 4-15, 184-270

<http://site.ebrary.com/lib/uasuaysp/docDetail.action?docID=10431028&p00=Conservaci%C3%B3n+de+los+alimentos>.

Consulta: Enero 2012

ESCALONA ROSABAL, Armando. (2009). Peligros microbiológicos e inocuidad de alimentos. Editorial: El Cid Editor. Argentina. Pág. 4-7

<http://site.ebrary.com/lib/uasuaysp/docDetail.action?docID=10317115&p00=Peligros+microbiol%C3%B3gicos+e+inocuidad+de+alimentos>

Consulta: Febrero 2012

HENRÍQUEZ JELVES, Manuel (2005) Control microbiológico de superficies. Santiago de Chile

http://www.slideshare.net/tigerland/control-superficies-29?src=related_normal&rel=3514839

Consulta: Abril 2012

HERRANZ SORRIBES, Carmen. (2008). Métodos rápidos y automatizados en microbiología alimentaria. Universidad Complutense de Madrid. Pág. 109-116

http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Monografico_VI_workshop_MRAMA.pdf

Consulta: Marzo 2012

MARTIN DE SANTOS, Rosario. (2010). Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de alimentos. Universidad Complutense de Madrid. Pág. 75-91

<http://93.189.33.183/index.php/mono/article/viewFile/1108/1125>

Consulta: Marzo 2012

MICHANIE, Silvia. (2005). Métodos alternativos, precisos y rápidos para el control microbiológico de alimentos. Universidad de Belgrano y de la UTN, Buenos Aires. Pág. 1-9

http://www.bpm-haccp.com.ar/index_archivos/pdf/Metodos-Microbiologicos-Alternativos.pdf

Consulta: Marzo 2012

NORMAS LEGALES 346583. (2007). Guía técnica para el Análisis Microbiológico de Superficies en contacto con los Alimentos y Bebidas. Pág.1-14

<http://es.scribd.com/doc/46067731/RM-461-2007-SUPERFICIES>

Consulta: Febrero 2012

NORMA UNEN 100012. (2006). Higienización de sistemas de climatización.

<http://www.higieneambiental.com/calidad-de-aire-interior/norma-une-100012-de-higienizacion-de-sistemas-de-climatizacion>

Consulta: Abril 2012

NORPACIFIC S.A. El control microbiológico del aire. Lima. Pág.1-3

http://www.norpacific.com.br/spanish/dicas/docs/062_1.pdf

Consulta: Abril 2012

PRUEBAS RÁPIDAS PARA PATÓGENOS

<http://www.serco.com.mx/productos/inocuidad/pruebas-rapidas-de-patogenos.html>

Consulta: Abril 2012

PUIGDOMENECH, Germán Luis. (2009). Microbiología: concepto e historia. Editorial: El Cid Editor. Argentina. Pág.5-23

<http://site.ebrary.com/lib/uasuaysp/docDetail.action?docID=10312039&p00=Microbiolog%C3%ADa%3A+concepto+e+historia>

Consulta: Enero 2012

ROSER ROMERO DEL CASTILLO, Shelly y MESTRES LAGARRIGA, Josep (2004). Productos lácteos. Tecnología. Pág. 19-31, 41-43

http://books.google.com.ec/books?id=HUugK6Ep_JkC&printsec=frontcover&dq=ROSER+ROMERO+DEL+CASTILLO,+Shelly++y+MESTRES+LAGARRIGA,++Josep&hl=es&sa=X&ei=-P-JT5StJ4vqtgfwvazNCQ&sqj=2&ved=0CDEQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false

Consulta: Enero 2012

VIP GOLD. Pág. 1-2

[http://187.141.254.50/apps/ierm/faqs.nsf/90c9ef7d3fabe69886256fff00019e34/a82dec8392c7b9238625725f007c429e/\\$FILE/SC-INO-VIPGold-01.pdf](http://187.141.254.50/apps/ierm/faqs.nsf/90c9ef7d3fabe69886256fff00019e34/a82dec8392c7b9238625725f007c429e/$FILE/SC-INO-VIPGold-01.pdf)

Consulta: Abril 2012

3M PLACAS PETRIFIILM™ PARA EL RECUENTO DE AEROBIOS. Pág. 1-6

<http://www.3m.com/cms/MX/es/0-253/kFFRcFN/view.html>

Consulta: Abril 2012

3M PLACAS PETRIFIILM^{MR} PARA EL RECUENTO DE E. COLI Y COLIFORMES TOTALES. Pág. 1-6

<http://www.3m.com/cms/MX/es/0-253/kFFRFFP/view.html>

Consulta: Abril 2012

3M PETRIFIILM™ ENVIRONMENTAL MONITORING PROCEDURES. Pág. 1-4

http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf

Consulta: Abril 2012

3M PLACAS PETRIFIILM™ PARA MOHO Y LEVADURAS. Pág. 1-8

<http://www.3m.com/cms/MX/es/0-253/kFFRrFQ/view.html>

Consulta: Abril 2012

3M PLACAS PETRIFIILM™ STAPH EXPRESS PARA EL RECUENTO DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS. Pág. 1-6

<http://www.3m.com/cms/MX/es/0-253/krzRuFX/view.html>

Consulta: Abril 2012