



UNIVERSIDAD DEL AZUAY

DEPARTAMENTO DE POSGRADOS

MAESTRÍA EN GESTIÓN DE CALIDAD Y SEGURIDAD

ALIMENTARIA

“Determinación de Escherichia Coli O157:H7 (EHEC) en la carne molida que se vende en el mercado el Arenal de la ciudad de Cuenca”

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGÍSTER EN GESTIÓN DE CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

AUTOR:

Federico Vicente Tapia Jara

DIRECTORA:

Mgst. Miriam Briones García

CUENCA, ECUADOR

2016

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis dos queridas mujeres Sandra y Camila que siempre estuvieron apoyándome desde el inicio hasta alcanzar este gran objetivo que es parte de mi superación profesional.

A mis queridos padres Vicente y Lucía por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, y por su apoyo incondicional mantenido a través del tiempo.

A papa Dios por darme salud y sabiduría para salir adelante y alcanzar las metas anheladas.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a la Magister Miriam Briones por su apoyo brindado durante la elaboración de este trabajo.

A la Ingeniera María Fernanda Rosales por la ayuda otorgada tanto en la parte técnica como intelectual en este trabajo.

A Alexandra Cerezo representante de APRCOM S.A por todas las facilidades brindadas para realizar los ensayos de esta investigación.

A todos mis amigos, compañeros de trabajo y personas especiales que han demostrado su comprensión y motivación a lo largo de mis estudios y culminación de este proyecto.

RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo determinar la presencia de Escherichia Coli Enterohemorrágica O157:H7 en la carne molida que se expende en las tercenas del mercado El Arenal de la ciudad de Cuenca. Se tomaron 78 muestras en tres días diferentes que corresponden a 26 puestos, éstas fueron tratadas con caldo de enriquecimientos y luego lisadas (ruptura de la membrana celular de las bacterias) para su posterior análisis con el método de ANSR® el cual detecta inmediatamente el ADN de las bacterias, para lo cual se da una reacción isotérmica que replica el ADN a una temperatura constante a 56°C, las secuencias de ADN amplificadas son detectados por sondas moleculares fluorescentes. De las 78 muestras analizadas todas arrojaron resultados negativos, sin embargo no se descarta que estén contaminados por otros microorganismos patógenos incluidos las del mismo grupo E.coli debido a una mala práctica de manipulación. Como apoyo de prevención se elaboró un Instructivo de Buenas Prácticas de Manufactura mismo que fue socializado a los propietarios de las tercenas.

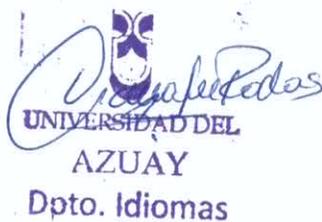
PALABRAS CLAVES:

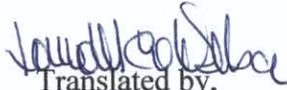
Escherichia Coli Enterohemorrágica O157:H7, carne, lisis, ANSR, ADN, instructivo

ABSTRACT

This study aims to determine the presence of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef sold in butchers' shops at *El Arenal* market in the city of Cuenca. Seventy eight samples, which correspond to 26 shops, were taken in three different days. These samples were treated with broth enrichments media, and then lysed (rupture of the cell membrane of bacteria) with the ANSR® method for further analysis, which immediately detects the bacteria DNA. This produces an exothermic reaction that replicates the DNA at a constant temperature at 56 °C; then, the amplified DNA sequences are detected by fluorescent molecular probes. Of the 78 samples analyzed, all tested negative; however, it is not excluded that they are contaminated by other pathogens including the same *E. coli* group because of a manipulation bad practice. As prevention support, an Instruction Manual of Good Manufacturing Practices, which was presented to the butchers 'shops owners, was developed.

KEYWORDS: Enterohaemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7: H7, Meat, Lysis, ANSR, DNA, Instruction Manual




Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDOS	pág.
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT AND KEYWORDS.....	IV
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
ÍNDICE DE ANEXOS.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
CAPÍTULO I	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
1. Lugar del muestreo.....	10
1.1. Objetivo de la Investigación.....	10
1.2. Fundamento de la técnica.....	10
1.3. Ubicación donde se desarrollaron los ensayos.....	11
1.4. Tamaño de la Muestra.....	11
1.5. Recolección de las muestras.....	11
1.6 Determinación de la Escherichia Coli O157H:7 por ANSR.....	12
1.6.1 Rehidratación del Caldo de enriquecimiento ANSR para E. Coli.....	12
1.6.2 Preparación de la carne.....	12
1.6.3 Prueba para la determinación de E. Coli O157:H7 por ANSR®.....	12

CAPÍTULO II	
RESULTADOS.....	14
2. INTERPRETACIÓN DE DATOS	14
CAPÍTULO III	
DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIONES.....	23
BIBLIOGRAFÍA.....	24
ANEXOS	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de los análisis E.coliO157:H7 en la carne molida tomadas en las terceras del mercado mayorista el Arenal de la ciudad de Cuenca.....	14
Tabla 2. Datos generados del primer lote de lectura.	15
Tabla 3. Datos generados del segundo lote de lectura.	16
Tabla 4. Datos generados del tercer lote de lectura.	17
Tabla 5. Datos generados del cuarto lote de lectura.	18
Tabla 6. Datos generados del quinto lote de lectura.	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de un test negativo.	15
Figura 2. Gráfico generado del primer lote de lectura.	16
Figura 3. Gráfico generado del segundo lote de lectura.	16
Figura 4. Gráfico generado del tercer lote de lectura.	17
Figura 5. Gráfico generado del cuarto lote de lectura.	18

Figura 6. Gráfico generado del quinto lote de lectura. 19

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Norma INEN Control microbiológico de los alimentos. toma, envío y preparación de muestras para el análisis. 26

Anexo 2: Norma INEN Carne y Productos Cárnicos.Carne Molida.Requisitos..... 35

Anexo 3. Norma INEN Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico. 42

Anexo 4. Recolección y procesamiento de muestras..... 61

Anexo 5. Lotes del kit ANSR®, empleados para los análisis. 63

Anexo 6. Prueba para la determinación de E. coli O157:h7 por el método de ANSR® 65

Anexo 7. Certificado por la AOC Research Institute. 66

Anexo 8. Instructivo de Buenas Prácticas de Manufactura. 67

Anexo 9. Figuras de los resultados obtenidos en las 78 muestras analizadas. 79

Anexo 10. Registro de socialización del Instructivo de Buenas Prácticas de Manufactura. 109

Federico Vicente Tapia Jara

TRABAJO DE GRADUACIÓN

Mgst. Miriam Briones García

Julio, 2016

“Determinación de Escherichia Coli O157:H7 (EHEC) en la carne molida que se vende en el mercado el Arenal de la ciudad de Cuenca.”

INTRODUCCIÓN

El origen de las ETAS (Enfermedades transmitidas por los alimentos) se documenta y aplican una legislación a partir del siglo X con el botulismo en Bizancio. En el siglo XIX Luis Pasteur descubre que el deterioro de los alimentos es producido por las bacterias. Para el siglo XX se produce un gran desarrollo de la microbiología y se puede determinar el origen de las ETAS, se suma a esto los conceptos en los sistemas de calidad como son GMP (Good Manufacturing Practices), HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Points); pese a todos estos adelantos prevalecen las enfermedades e intoxicaciones producidas por los alimentos.

En este nuevo siglo con los cambios socioculturales, variedad de alimentos, los hábitos de consumo y su forma de producción que va desde la cadena primaria, procesamiento producto terminado y finalmente llegando al consumidor, siguen manteniéndose las intoxicaciones por malas prácticas de manufactura; podríamos decir que a nivel mundial estamos afrontando otra dimensión de peligros alimentarios para la salud pública.

Se han detectado más de 250 diferentes tipos de microorganismos causantes de ETAS, que involucran a virus, parásitos y bacterias dentro de este último grupo se destaca la Escherichia Coli Enterohemorrágica (EHEC) o serotipo O157:H7 esta bacteria fue aislada por primera vez como patógeno humano en 1982, fue relacionada por la ingesta de carne molida mal cocida (Doyle 2001), desde entonces esta bacteria ha venido siendo aislada y estudiada, la infección por este patógeno está asociado frecuentemente a la colitis hemorrágica y en muchos de los casos seguidos por el síndrome urémico hemolítico (SUH), o púrpura trombocitopénica trombótica (PTT).

Los controles de aislamientos de E.coli O157 en productos cárnicos son diferentes en los países de Latinoamérica; Uruguay aisló el 1,8% de STEC O157 en carne picada fresca, en Lima en una investigación de 102 muestras de carne de bovino molida se encontró un 22,55% positivo para E. Coli O157, en la región de Argentina en el 2013 se aislaron STEC O157 en el 12% de las muestras de carne picada analizadas (Juré et al. 2015).

En el Ecuador existe un solo estudio realizado sobre la presencia de Escherichia Coli O 157:H7; en 600 muestras fecales de animales bovinos se aislaron E.coli una por cada muestra fecal recogida, de este grupo 32 fueron confirmadas con fenotipo típico E.coli O157:H7 (Trueba et al.2013).

La Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica quien publica la Gaceta Epidemiológica donde se encuentra los brotes epidemiológicos y otros eventos relacionados con la Salud Pública de notificación obligatoria nacional e internacional y cuya información es recopilada por medio del Sistema Integrado de Vigilancia Epidemiológica (SIVE) hasta la fecha no ha emitido reportes de intoxicación por E.coli O157:H7. (MSP 2016).

El reservorio natural de este patógeno es el tracto gastro intestinal de los rumiantes en particular del ganado vacuno, el origen en estos animales puede ser en los piensos o el agua contaminada, (Conedera et al 2004); se debe también considerar otros rumiantes como son las ovejas, cabras y ciervos.

La bacteria puede transmitirse al hombre por el consumo de alimentos contaminados con estiércol del rumiante como es en la carne picada, molida cruda o poco cocida y leche sin pasteurizar; otra fuente importante es la contaminación fecal del agua y de otros alimentos como verduras de hojas verdes (Ray y Bhunia 2007), así como también la contaminación cruzada que pueda darse al momento de la preparación de estos (carnes, derivados cárnicos, superficies y utensilios de cocina contaminados).

El derecho a consumir carne sana segura no debería ser solo un deseo, esto exige a que todos los actores sociales se vean involucrados y comprometidos (Medin et al 2015); dentro de esta cadena tenemos en primer lugar al productor (ganadero) quien debe garantizar el suministro de un alimentos sano (higiene microbiológica, ausencia de antibióticos, metales, pesticidas.), en el segundo eslabón está el faenamiento que se lo debe realizar aplicando buenas prácticas las misma que permiten reducir la contaminación de las carcasas por heces, pero esto no garantiza la ausencia de EHEC en los productos, ya que adelante tenemos la etapa del transporte y manipulación en los puntos de expendio en los cuales podría verse contaminada la carne, en nuestro país la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2346:2010 (1R) (ANEXO1) establece los requisitos generales que debe cumplir la carne en general y ciertos criterios de control que se deben tomar al momentos de faenar y transportar la carne.

En los puntos de expendio lo más recomendable es que la carne molida sea consumida lo antes posible ya que durante el proceso de picado encontramos una mayor área de contacto y se vuelve susceptible a crecimientos bacterianos, por otro lado la mayor superficie afecta la oxidación de la carne y disminuye las características de aroma y sabor (Arguello 2010). La carne molida debe cumplir con los parámetros exigidos según la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1346:2010 (1R) (ANEXO 2).

Con los antecedentes antes mencionados y la falta de estudios realizados en los puntos de venta de carnes en el país, el presente trabajo investigativo determinará la presencia o ausencia de EHEC O157:H7 en las terneras del mercado mayorista el Arenal, ubicado en la ciudad de Cuenca.

La E. Coli serotipo 0157:H7 es una variedad de E. Coli, un habitante normal de los intestinos de los animales, incluyendo a los seres humanos (FDA 2002). El patógeno produce grandes cantidades de una o más toxinas llamadas Shiga la misma que causa graves daños a la mucosa del intestino y otros órganos. Las complicaciones más severas son la colitis hemorrágica, diarrea con sangre y en las víctimas más jóvenes y pacientes adulto mayor puede desarrollar el síndrome urémico hemolítico (SUH).

El patógeno se propaga por la vía fecal oral, y la dosis infectiva mínima requerida es de 500 bacterias E coli Enterohemorrágica que se ha podido hallar en los productos cárnicos, como carne picada, hamburguesas, zumo de frutas no pasteurizadas, frutas y vegetales y también en agua no tratada. Como referencia de contaminación una planta procesadora de cárnicos en el año de 1997 tuvo que cerrar debido a que sus productos cárnicos estuvieron contaminados por E. Coli O157:H7 (Prescott et al 2010).

La bacteria pertenece al género *Escherichia* forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*; la E. Coli está dentro del grupo de las E. coli enterohemorrágica ya que las características de sus citotoxinas inhiben la síntesis proteica, cabe indicar que no producen enterotoxina termo lábiles y termo estables de las células. El nombre proviene del antígeno somático (O) de naturaleza polisacáridica identificado como 157 que se origina de la pared celular, y el séptimo antígeno flagelar (H), propio de especies móviles; este serotipado fue propuesto por Kauffman en 1940.

Las cepas de E coli O157:H7 (EHEC) también se les llama E. Coli productor de Verotoxina (VTEC) lleva este nombre debido a la capacidad de destruir las células Vero (células verdes del mono africano), investigaciones han determinado la existencia de al menos dos vero toxinas llamadas VT I y VT II, y por su similitud a la toxina Shiga se les denomina, SLT1 y SLT2, producido por el género *Shigella* (Adams y Moss 2005). Existen muchos subtipos de ambas toxinas, sin embargo la Stx2 está más relacionada con las enfermedades en los humanos, y se asocia con el síndrome hemolítico urémico (SUH) que se caracteriza por insuficiencia renal aguda, a nivel del intestino desarrollan la isla de patogenicidad llamado Locus de Destrucción del Enterocito o LEE siglas en inglés que es una proteína que permite la unión bacteriana a las células epiteliales (FDA 2012).

El microorganismo se desarrolla a una temperatura desde los 7°C a los 50° C, siendo su temperatura óptima alrededor de 37°C, es ácido tolerante puede crecer a pH inferior a 4,4; su aw es de 0,95 (Adams y Moss 2005). Estudios de inoculación han dado como resultado que la E. Coli O157:H7 sobrevive a factores de desecación, fermentación y en los embutidos fermentados con pH de 4,5 mismos que han sido guardados por 2 meses a 4°C.

El calentamiento adecuado de los alimentos de origen animal a una temperatura de por lo menos 68,3°C por 15 a 20 segundos, se puede considerar como un punto crítico de control que garantiza la inactivación de la bacteria (Doyle 2001).

El principal reservorio de la bacteria son los animales bovinos sin embargo se ha podido identificar en ovino, caprino, perros y gatos, se estima que más de la tercera parte de los terneros y vacas sanas son portadores intestinales de algún tipo de EHEC, la bacteria puede permanecer dentro de los intestinos del rumiante por treinta días, y en algunos animales el patógeno puede estar por más de un año, que factores favorecen a que el microorganismo colonice y permanezca en el intestino se desconocen.

A nivel de los canales en la etapa de evisceración y desollado en el caso que la bacteria EHEC estuviere presente en el contenido intestinal esta podría contaminar las superficies de las canales y vísceras, sumado a esto se puede dar la contaminación cruzada en las maquinarias, otras fuentes de contaminación son por manipulación, el ambiente, el agua de escaldado y agua empleada en el matadero (Sánchez et al 2009).

La bacteria puede ser identificada en los alimentos en placas de cultivo selectivos, entre estos tenemos agar MacConkey, a diferencia de la E. Coli, la O157:H7 no fermenta el sorbitol y son negativos al ensayo de MUG (flurogeno 4-metilumbeliferil-β-D-glucuronido) que es hidrolizado por la glucoronidasa para producir 4-metilumbeliferona fluorescente; esto permite diferenciar el serotipo O157:H7 de E. Coli, existen pruebas para determinar la virulencia y antígenos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Adams y Moss 2005).

El índice de mortalidad por el síndrome urémico hemolítico está alrededor del 3% al 5%(FDA 2012). El predominio mayor de la bacteria es en los niños de menos de 5 años y disminuye paulatinamente con la edad y en las personas de 65 años o más aumenta, en estos dos extremos de las edades la E.coliO157:H7 deja secuelas y lleva a la muerte (Doyle 2001).

La dosis infectiva de EHEC es muy baja para producir la enfermedad un número inferior a 5 células o dos bacteria por 25 gramos de producto (CE 2000).

La patogenia de la enfermedad puede pasar desde un cuadro clínico asintomático es decir una diarrea sin sangre y llevarnos a una colitis hemorrágica, y un síndrome hemolítico urémico (SHU) y púrpura trombótica trombocitopénica; su periodo de incubación normalmente va entre 3 a 4 días sin embargo puede variar en algunos casos de 1-10 días.

La enfermedad inicia con dolor abdominal y diarrea acuosa, luego de dos días en más del 70% de los casos suele aparecer la colitis hemorrágica con presencia de heces sanguinolentas, dolor abdominal agudo y sin fiebre. En un 30 a 60% de los casos pueden manifestarse con vómitos. En la mayoría de enfermos con colitis hemorrágica curan por sí solo en un lapso de 4 a 10 días sin tratamiento específico; sin embargo en otros casos puede

complicarse después de 5 a 10 días en los que el pacientes pueden manifestar el SHU que consiste en un fallo a nivel renal agudo acompañado de anemia hemolítica (reducción del número de glóbulos rojos) y trombocitopenia (descenso del número de plaquetas sanguíneas); suele también presentar lesiones a nivel del sistema nervioso lo que conlleva al coma y finalmente a la muerte del paciente .

Para el diagnóstico de la enfermedad se han desarrollado medios selectivos y diferenciales debido a su incapacidad de fermentar el sorbitol; para esto se emplea placas con agar Mac Conkey que contiene sorbitol al 1% y en estas se inocula las muestras de diarrea con sangre permitiendo aislar las colonias que no fermentan el sorbitol, además se puede realizar pruebas confirmatorias de E. Coli con ensayos bioquímicos; con inmunoensayos se demuestra que poseen el antígeno somático O157 y el antígeno flagelar H7. Para la determinación de la verocitotoxina o sus genes, se puede emplear técnicas con inmuno absorción ligado a enzimas, aglutinación y PCR.

El tratamiento de pacientes infectados es de sostén a base de hidratación y comida blanda, el empleo de los antibióticos es controversial y generalmente se los evita pues no reducen los síntomas, no previene las complicaciones, no controla la propagación y puede aumentar el riesgo de SUH.

La población perceptiva a E. Coli O157:H7 son los niños y las personas de la tercera edades son más susceptibles a ser contagiados, otro grupo a ser tomado en cuenta son las personas inmunodeprimidas, personas que cursan enfermedades crónicas SIDA, cáncer; sin embargo todos los grupos de edad pueden ser contagiados (FDA 2012).

La incidencia de casos presentados a nivel mundial desde su primer reporte en 1982 ha ido incrementado a nivel mundial en distintos países del mundo, sin embargo la mejora en los sistemas de vigilancia y los sistemas de calidad han permitido que se vaya controlando paulatinamente.

Dos brotes a gran escala se han podido registrar, el uno en Japón y otro en China siendo responsable la cepa patógena EHEC O 157:H7 que se encontraba en los vegetales (Yi et al 2010).

Se estima que en los Estados Unidos se produce al año entre 10.000 a 20.000 casos la mayor parte de estos brotes es debido al consumo de hamburguesas; en el año de 1997 en la Unión Europea se identificaron siete caso de VTEC y un caso de SUH por millón de habitantes (Sánchez et al 2009).

En el Reino Unido se registró el mayor brote en el año de 1996, cuyo origen fue producido por lunch y bistec contaminados de una carnicería de la localidad de Wishaw, Lanarkshire, y fueron afectadas 256 personas de las cuales 16 fallecieron (Rivas et al 2008).

Canadá ha reportado infecciones de E. Coli O157:H7 con un número de 5,3 casos/100.000 habitantes, siendo la fuente de contaminación la carne molida mal cocida, y el contacto directo con el ganado (Rivas et al 2008).

Los métodos para determinar a los microorganismos a lo largo del tiempo han ido evolucionando es así que se dio inicio con los medios de cultivo en los cuales podemos identificar formas, tamaños y color de las colonias, el siguiente paso que dio a la investigación para identificar a los patógenos fue la técnica de Elisa basado en la reacción antígeno anticuerpo en la cual interviene una proteína que les permite unirse, este método se da en tres pasos, seguido a este llegó el método de flujo lateral basado en el mismo principio de Elisa pero en un solo paso; a esto le sigue el método de PCR que consiste en la amplificación del ADN seguido por la interacción de oligonucleótidos complementarios.

Por último tenemos el Método de Amplificación Isotérmica ANSR® (Amplified Nucleic Single Temperature Reaction) mismo que ha sido utilizado para el presente trabajo investigativo y cuya metodología consiste en una amplificación única isotérmica, replicando el ADN de la bacteria presente en el alimento a una temperatura constante empleando una polimerasa para amplificar exponencialmente el ADN a 56°C, la muestra deberá estar enriquecida a niveles detectables donde el ácido nucleico objetivo es amplificado y su sistema emplea ondas nucleares fluorescentes para la detección en tiempo real. Este sistema tiene la capacidad de determinar la ausencia o la presencia de la bacteria E. Coli O157:H7 en 10 minutos.

Objetivo general:

Determinar la presencia de E. Coli Entero Hemorrágica O157: H7 en la carne molida que se encuentra en las tercenas del mercado El Arenal de la ciudad de Cuenca.

Objetivos específicos:

- Establecer la calidad microbiológica de E. Coli de la carne en los diferentes puntos de venta.
- Proponer programas de control y educación sostenida con las instituciones responsables de vigilar toda la cadena productiva de la carne.
- Establecer medidas que contribuyan a disminuir la contaminación microbiológica.
- Elaborar un instructivo de Buenas Prácticas de Higiene y Manipulación de Alimentos.

CAPÍTULO I

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar del muestreo

Para el desarrollo de esta investigación la toma de muestras se la realizó en el mercado mayorista El Arenal de la ciudad de Cuenca, mismo que es administrado por el Ilustre Municipio de Cuenca, dentro del interior se encuentra registrados alrededor de 40 tercenas la mismas que se abastecen de la carne que es faenada en el camal municipal de la ciudad de Cuenca.

1.1. Objetivo de la Investigación

El objetivo del presente trabajo consistió en determinar si la carne molida que se expenden en las tercenas del mercado el Arenal se encuentran o no contaminadas con la bacteria *Escherichia Coli* O157:H7 (EHEC), para realizar estos ensayos se empleó el método de ANSR® mismo que permite la amplificación del ADN in vitro.

1.2. Fundamento de la técnica

El ANSR (Amplified-Nucleic-Single temperature-Reaction), es una reacción isotérmica que replica el ADN a una temperatura constante y para esto emplea una polimerasa que amplifica exponencialmente el ADN de cualquier bacteria objetivo que esté presente en una muestra de alimento enriquecida hasta niveles detectables. El ácido nucleico objetivo en una primera etapa es fraccionado por la acción de una endonucleasa, luego por un proceso de polimerización desde los extremos de cortes creados por la endonucleasa en el ADN son amplificadas. Las secuencias de ADN amplificadas son detectadas en tiempo real empleando sondas moleculares fluorescentes (NEOGEN 2013).

En dos etapas se lleva una reacción de lisis, primero a 37°C durante 10 minutos, luego a 80 °C durante 20 minutos. A continuación una porción de la muestra lisada se transfiere a un tubo de tira que contiene los reactivos ANSR liofilizadas. Los tubos se sellan y se incuban a 56°C en el lector ANSR. Los resultados son generados por el lector y se muestran en el software ANSR en 10 minutos. Las pruebas positivas pueden ser confirmadas a partir de los cultivos de enriquecimiento siguiendo los procedimientos estándar. Cada tubo de reactivos ANSR contiene un control positivo interno, asegurando que los reactivos están funcionando correctamente. Los resultados de la prueba ANSR *E. coli* O157: H7 proporcionan evidencia de que el rendimiento global de la de ensayo es equivalente a la USDA-FSIS / MLG o métodos de referencia de la FDA / BAM. ANSR, es una alternativa eficaz para la detección de *E. coli* O157: H7 después de 12 -24 h de enriquecimiento de la carne molida, carne de vacuno, agua de riego de semillas germinadas y espinacas, es un método que se encuentran validados por la AOAC (NEOGEN 2013).

1.3. Ubicación donde se desarrollaron los ensayos

Los análisis se realizaron en los laboratorios de microbiología de la Universidad del Azuay, ubicados en la parroquia Huayna Capac, cuya dirección es Hernán Malo y Av. 24 de Mayo.

La carne molida fue tomada de las tercenas del mercado mayorista el Arenal ubicado en la Av. de las Américas y Amazonas de la ciudad de Cuenca.

1.4. Tamaño de la Muestra

Para el desarrollo del presente estudio se analizaron **78 muestras** de carne molida.

El tamaño de la muestra se calculó tomando un universo contable, a partir de los 40 establecimientos que venden carne molida de res, para el cálculo se aplicó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{z^2 * N * (p * q)}{e^2 * (N - 1) + (p * q) * z^2}$$

(Barojas2005).

Donde:

n= tamaño de muestra.

N= Tamaño de la población.

Z=valor correspondiente a la distribución de Gauss, $z_{\alpha=0.05} = 1.96$.

p = probabilidad, 5 %.

q = 1-p.

e = error esperado, 5 %.

El tamaño de la muestra obtenida fue de 26 locales a ser muestreados esto por tres días diferentes obtenemos 78 muestras.

1.5. Recolección de las muestras

La recolección de las muestras de carne molida se realizó tomando como referencia las indicaciones la Norma Técnica Ecuatoriana INEN1529-2:2013 (1R) (ANEXO3), esto se realizó en una semana los días lunes, miércoles y viernes en horario de la mañana en el mes de julio; para esto se emplearon espátulas de acero inoxidable las mismas que fueron esterilizadas en seco a 170° C para cada toma; la cantidad tomada fue de 80g aproximadamente y depositadas en fundas estériles (ANEXO 4).

1.5.1. Transporte y conservación de las muestras.

Las muestras recolectadas fueron rotuladas y transportadas en *coolers* que contenían unidades de enfriamiento, su temperatura estuvo entre 4°C a 5°C aproximadamente, finalmente fueron almacenadas en una nevera a 5° C (ANEXO 4).

1.6 Determinación de la Escherichia Coli O157H:7 por ANSR

Con la finalidad de determinar E. Coli O157:H7 se empleó el kit ANSR® (Lote N°2 26545, fecha de expiración julio 21-2016), caldo de enriquecimiento ANSR® para E. Coli (Lote N° 218468, fecha de expiración junio 30-2019) (ANEXO 5).

El protocolo a seguir para los análisis es el siguiente:

1.6.1 Rehidratación del Caldo de enriquecimiento ANSR para E. Coli.

Se rehidrato 39,6 g del medio en 1L de agua estéril precalentada a 42° C, el medio no requiere ser auto clavado, los medios se utilizaron el mismo día que se preparó. Se tomó 325 ml de caldo hidratado y se pasó a las nuevas fundas estériles (ANEXO 4).

1.6.2 Preparación de la carne.

1. De las bolsas que conservaban la carne molida se tomó 65 g y fueron transferidas a las nuevas fundas que contienen el caldo de enriquecimiento mismas fueron selladas y homogenizadas.
2. Finalmente las muestras fueron colocadas en una incubadora a 42°C ± 1° C durante 12 horas (ANEXO 4).

1.6.3 Prueba para la determinación de E. Coli O157:H7 por ANSR®.

Se procedió a reconstituir el frasco de reactivo liofilizado para la lisis con la adición de 18ml del tampón.

Pre calentamiento de los bloques para lisis y el lector de ANSR, el un bloque calentador de lisis a 80 + 2° C y el segundo bloque calentador de lisis a 37 + 2° C, el lector de ANSR a una temperatura de 56 + -1° C.

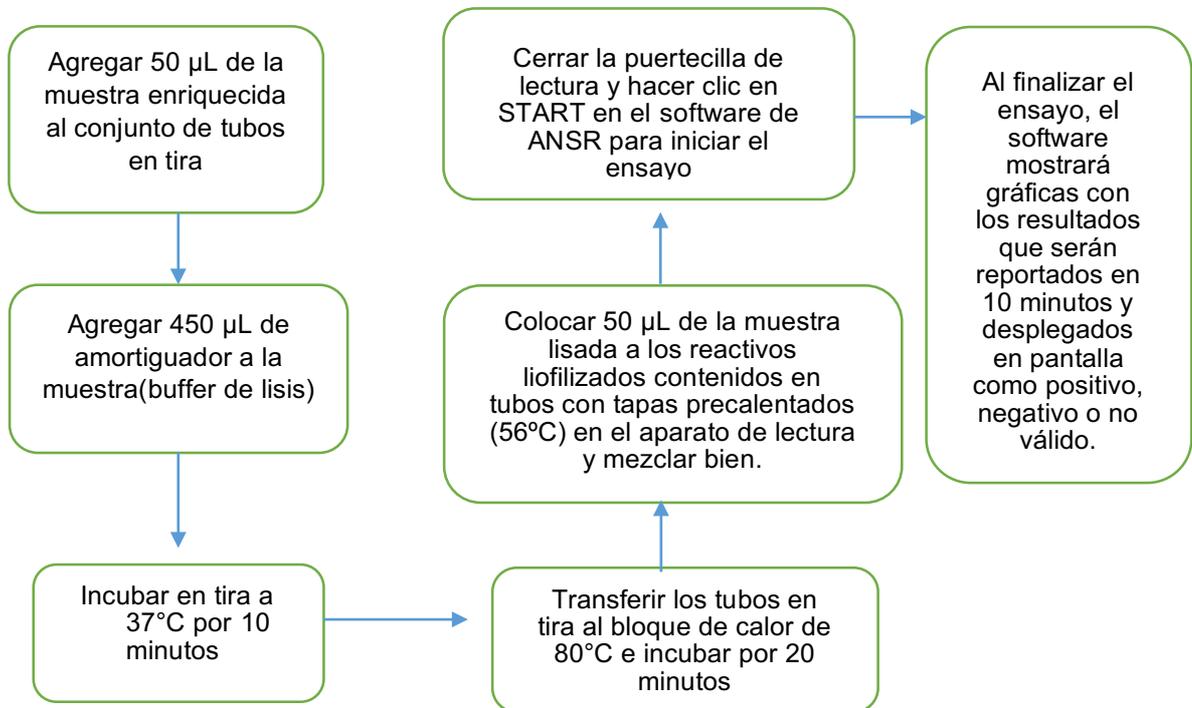
Encendido del ordenador una vez conectado al lector del ANSR.

Se tomó 50 µL de las muestras enriquecida y se pasó a los tubos en tira, luego se adicionó 450 µL de buffer de lisis, se transfirieron los tubos al calefactor de 37°C y se encubaron por 10 minutos, luego se pasan al segundo bloque calefactor de 80°C y se dejan por 20 minutos; una vez lisadas se tomó 50 µL y se pasó a los tubos precalentados (56°C) en el lector que contienen los reactivos liofilizados ANSR se mezclan y se sellan, se cierra la puertecilla del lector y finalmente se da lectura por medio del software ANSR. Los resultados se obtuvieron en 10 minutos los mismos que se presentan como negativos, positivos o inválidos y son graficados por el software (ANEXO 6).

Los análisis se realizaron por lotes de lecturas de corridas agrupadas por 16 muestras hasta completar las 78 muestras.

El método ANSR se encuentra certificado por la AOC Research Institute (ANEXO 7).

1.6.4 Diagrama de flujo para la determinación de E. Coli O157:H7 por el método ANSR



Fuente Dr. Federico Tapia J.

Dentro del objetivo planteado para este proyectos de investigación se ha elaborado un Instructivo de Buena Prácticas de Higiene y Manipulación de alimentos dirigidos a los propietarios de las tercenas, para la estructuración del mismos se ha tomado como referencia las resoluciones ARCSA-DE 067-015-GGG. (Normativa Técnica Sanitaria Unificada para Alimentos Procesados, Plantas procesadoras de Alimentos, Establecimientos de Distribución, Comercialización, Transporte de Alimentos y Establecimientos de Alimentación Colectiva.), y ARCSA-DE-057-2015-GGG (Normativa Técnica Sanitaria sobre Prácticas Correctas de Higiene para Establecimientos Procesadores de Alimentos Categorizados como Artesanales y Organizaciones del Sistema de Economía Popular y Solidaria),Manual de Capacitación para Manipuladores de Alimentos. (www.panalimentos.org) (ANEXO 8)

Con este aporte se quiere llegar de una manera muy didáctica a concientizar a todas las personas involucradas en la manipulación de la carne.

CAPÍTULO II RESULTADOS

2. Interpretación de datos

Del análisis de las 78 muestras tomadas en las tercenas del mercado mayorista el Arenal una vez analizadas por el método ANSR (Neogén Corporation) se desprende que dieron como resultado negativas para Escherichia Coli O157:H7.

El detalle de los resultados se puede observar en la tabla 1

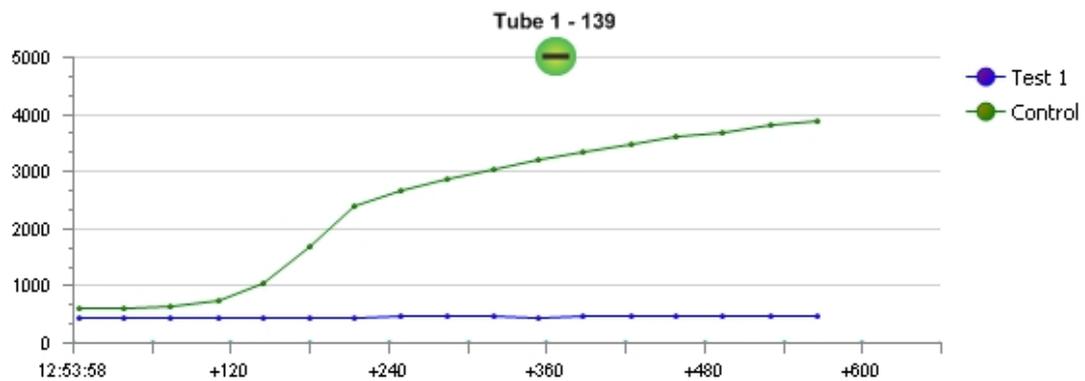
Tabla 1. Resultados de los análisis E.coliO157:H7 en la carne molida tomadas en las tercenas del mercado mayorista el Arenal de la ciudad de Cuenca.

RESULTADOS OBTENIDOS PARA LA DETERMINACIÓN E.coli O157:H7 POR EL MÉTODO ANSR

N°	1° LOTE DE LECTURA				2° LOTE DE LECTURA				3° LOTE DE LECTURA				4° LOTE DE LECTURA				5° LOTE DE LECTURA			
	N° DE PUESTO MUESTREADO	FECHA DE MUESTREO	E.coliO157:H7 POSITIVO	E.coliO157:H7 NEGATIVO	N° DE PUESTO MUESTREADO	FECHA DE MUESTREO	E.coliO157:H7 POSITIVO	E.coliO157:H7 NEGATIVO	N° DE PUESTO MUESTREADO	FECHA DE MUESTREO	E.coliO157:H7 POSITIVO	E.coliO157:H7 NEGATIVO	N° DE PUESTO MUESTREADO	FECHA DE MUESTREO	E.coliO157:H7 POSITIVO	E.coliO157:H7 NEGATIVO	N° DE PUESTO MUESTREADO	FECHA DE MUESTREO	E.coliO157:H7 POSITIVO	E.coliO157:H7 NEGATIVO
1	139	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	80	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	116	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	148	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	394	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
2	139	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	80	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	98	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	148	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	394	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
3	139	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	135	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	98	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	148	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	395	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
4	148	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	135	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	98	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	386	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	395	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
5	148	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	135	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	145	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	386	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	395	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
6	148	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	84	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	145	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	386	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	335	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
7	159	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	84	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	145	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	387	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	335	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
8	159	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	84	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	73	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	387	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	335	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
9	159	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	142	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	73	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	387	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	337	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
10	87	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	142	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	73	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	392	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	337	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
11	87	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	142	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	90	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	392	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	337	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
12	87	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	95	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	90	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	392	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	23	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
13	136	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	95	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	90	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	393	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	23	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
14	136	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	95	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	151	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	393	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	23	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
15	136	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	116	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	151	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	393	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>				
16	80	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	116	6/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	151	8/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	394	4/7/16	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>				

Para los resultados negativos de las muestras el software ANSR realiza una gráfica con dos líneas una de control (verde) que está por encima de la línea del test (azul), esto se puede interpretar que durante el proceso de replicación del ADN no se dió fluorescencia pues no estuvo presente el ADN de la bacteria E.coli O157:H7 en la muestra; normalmente para las muestras positivas la línea de ensayo sobrepasa al control.

Figura 1.Gráfico de un test negativo.



A continuación se podrá observar las gráficas y tablas generadas por el software ANSR que corresponde al consolidado de los lotes de lecturas que en total son 5, cada una con los 16 ensayos realizados.

Tabla 2. Datos generados del primer lote de lectura.

Lot ID: PRIMERO

SAMPLE ID	CH1	SAMPLE ID	CH1
01. 139	Negative	09. 159	Negative
02. 139	Negative	10. 87	Negative
03. 139	Negative	11. 87	Negative
04. 148	Negative	12. 87	Negative
05. 148	Negative	13. 136	Negative
06. 148	Negative	14. 136	Negative
07. 159	Negative	15. 136	Negative
08. 159	Negative	16. 80	Negative

Figura 2. Gráfico generado del primer lote de lectura.

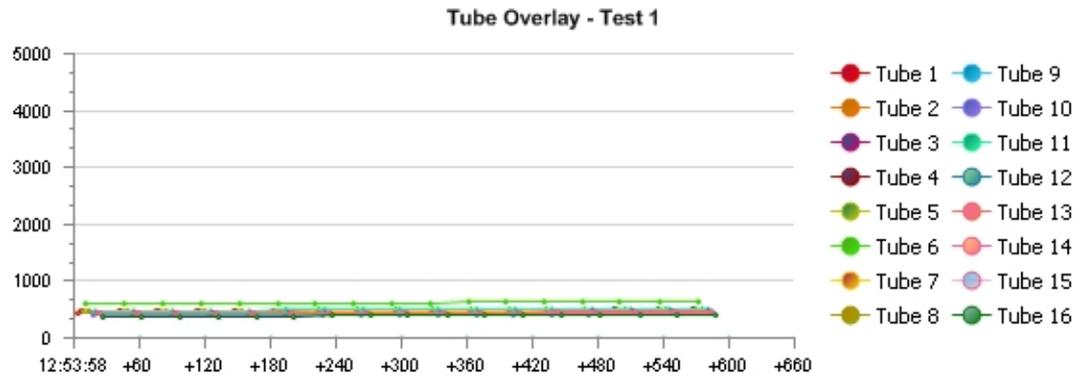


Tabla 3. Datos generados del segundo lote de lectura.

Lot ID: **SEGUNDO**

SAMPLE ID	CH1		SAMPLE ID	CH1
01. 80	Negative		09. 142	Negative
02. 80	Negative		10. 142	Negative
03. 135	Negative		11. 142	Negative
04. 135	Negative		12. 95	Negative
05. 135	Negative		13. 95	Negative
06. 84	Negative		14. 95	Negative
07. 84	Negative		15. 116	Negative
08. 84	Negative		16. 116	Negative

Figura 3. Gráfico generado del segundo lote de lectura.

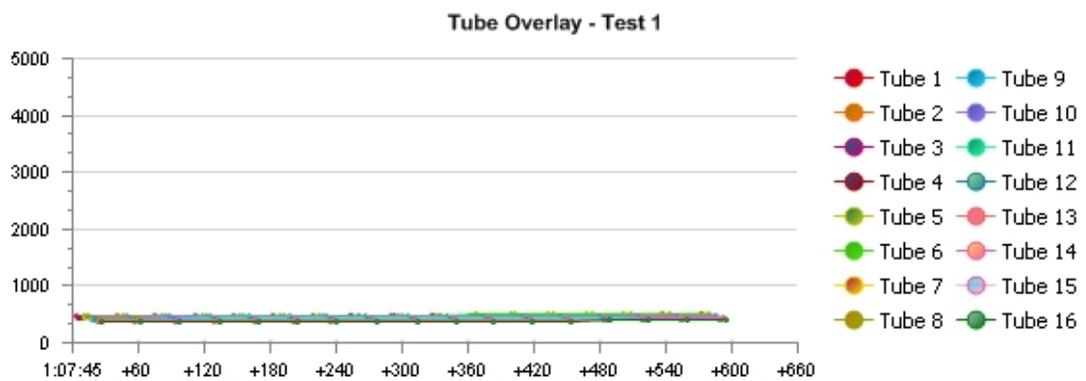


Tabla 4. Datos generados del tercer lote de lectura.

Lot ID: **TERCERO**

SAMPLE ID	CH1		SAMPLE ID	CH1
01. 116	Negative		09. 73	Negative
02. 98	Negative		10. 73	Negative
03. 98	Negative		11. 90	Negative
04. 98	Negative		12. 90	Negative
05. 145	Negative		13. 90	Negative
06. 145	Negative		14. 151	Negative
07. 145	Negative		15. 151	Negative
08. 73	Negative		16. 151	Negative

Figura 4. Gráfico generado del tercer lote de lectura.

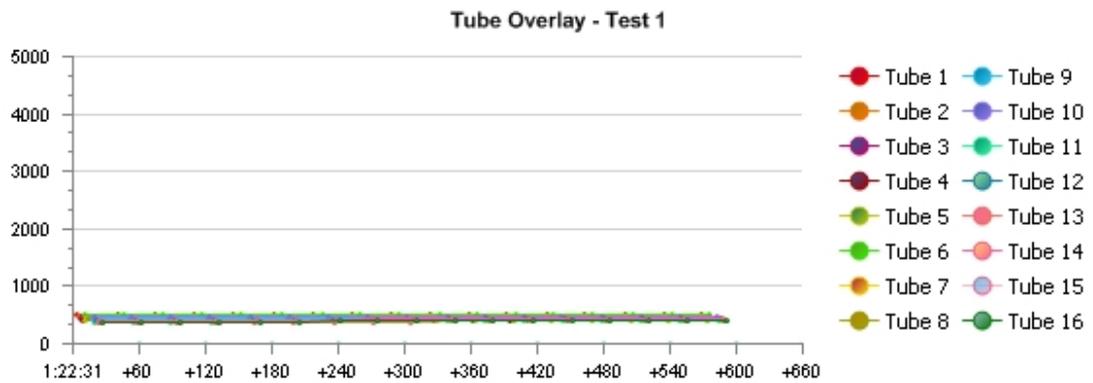


Tabla 5. Datos generados del cuarto lote de lectura.

Lot ID: CUARTO

SAMPLE ID	CH1	SAMPLE ID	CH1
01. 148	Negative	09. 387	Negative
02. 148	Negative	10. 392	Negative
03. 148	Negative	11. 392	Negative
04. 386	Negative	12. 392	Negative
05. 386	Negative	13. 393	Negative
06. 386	Negative	14. 393	Negative
07. 387	Negative	15. 393	Negative
08. 387	Negative	16. 394	Negative

Figura 5. Gráfico generado del cuarto lote de lectura.

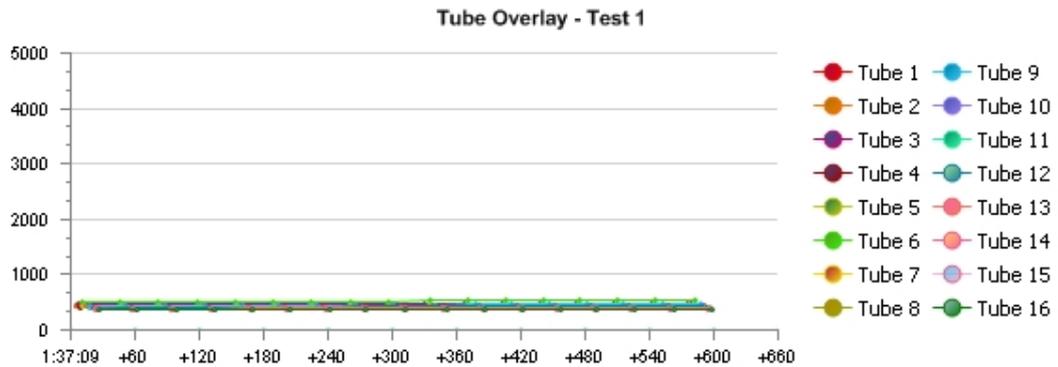
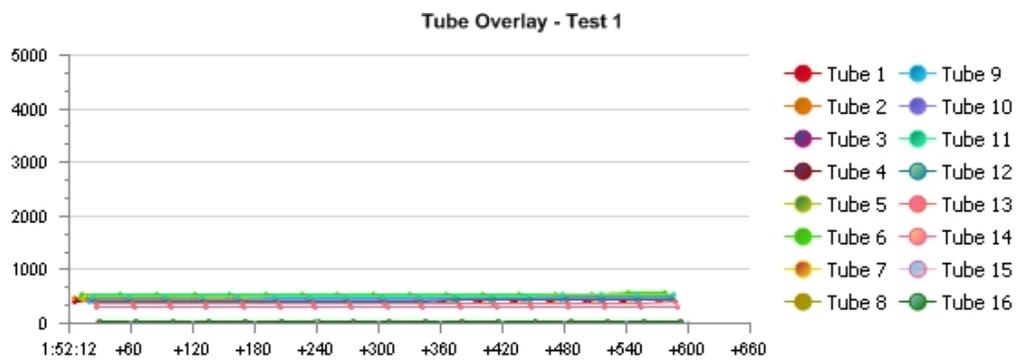


Tabla 6. Datos generados del quinto lote de lectura.

Lot ID: QUINTO

SAMPLE ID	CH1	SAMPLE ID	CH1
01. 394	Negative	09. 337	Negative
02. 394	Negative	10. 337	Negative
03. 395	Negative	11. 337	Negative
04. 395	Negative	12. 23	Negative
05. 395	Negative	13. 23	Negative
06. 335	Negative	14. 23	Negative
07. 335	Negative	15.	
08. 335	Negative	16.	

Figura 6. Gráfico generado del quinto lote de lectura.



Las figuras de los resultados obtenidos en las 78 muestras se pueden observar en el (ANEXO 9).

CAPÍTULO III

DISCUSIÓN

En la presente investigación las 78 muestras de carne molida dieron como resultado negativo a E.coli O157:H7 por el método de ANSR, sin embargo existe la posibilidad que la carne esté contaminada por Escherichia Coli como resultado de una mala manipulación, así lo demuestra una investigación realizada en la carne molida tomada en tres mercados de Guayaquil la misma que demostró que del total de las muestras tomadas que corresponde al 94,4% de sus valores se salían fuera de los límites establecidos por la norma INEN 1346:2010 para Escherichia Coli, y el 5,6% cumplía con lo establecido por la norma nacional, esto como resultado del inadecuado manejo de la carne (Buñay et al 2015).

Considerando que la contaminación por EHEC en los alimentos en general y de la carne en particular es principalmente debido al contacto con las heces del ganado (Mercado et al 2004) y que puede suscitarse al momento del faenamiento (Prescott et al 2004), presumiblemente esta actividad en el camal de la ciudad de Cuenca es óptima y no existe contagio hasta llegar al punto de venta y a su vez en estos lugares los manipuladores de carne no son portadores de la bacteria, de esta manera se descartó la posibilidad de contaminación por este medio dando como resultados negativos para E.coli Enterohemorrágica O157:H7.

En un estudio realizado por la universidad de San Francisco de Quito, en el cual se analizaron 600 muestras de hisopado rectal de ganado vacuno, de las cuales 32 dieron positivo para E. Coli O157:H7 demostrándose la presencia de la bacteria en las reses, si no se aplica la buenas prácticas de faenamiento podrían quedar contaminadas las canales (Trueba et al 2013); con el estudio realizado podríamos decir que EHEC no está presente en la carne que ingresa a las tercenas del Arenal proveniente del camal municipal, sin embargo queda abierta la posibilidad de realizar en Quito un estudio similar al presente.

Considerando que la presencia de esta bacteria y el brote de las infecciones se han reportado con mayor incidencia en los países desarrollados e industrializados (Palmeira et al.2005), y los reportes de los países poco industrializados tienen índices bajos, en una investigación realizada en Paraguay de 250 muestras entre carne picada y productos cárnicos cuyo propósito fue aislar E.coli 0157:H7 por medios bioquímicos y serológicos y su caracterización de virulencia se lo realizó por la técnica de PCR, dio como resultado 3 muestras positivas que equivale al 1,2% con genotipo stx2, eae y ehxa (Roldan et al 2007); en otro trabajo realizado en Argentina en las provincias de Corrientes y Chaco entre mayo del 2004 y julio 2006 en donde se analizaron 240 muestras de carne molida y 147 hisopados de reses bovinas, lográndose aislar una cepa E.coli O157.H7 stx2.(Cicuta et al 2006).Como se puede evidenciar en las investigaciones realizadas se considera un alto

número de muestras para obtener un bajo porcentaje de casos positivos para EHEC, del estudio realizado podríamos decir que para obtener resultados más favorables que evidencien la presencia del patógeno el muestreo debería ser ampliado a un mayor número de muestras.

La presente investigación realizada en la ciudad de Cuenca demostró la ausencia de EHEC, sin embargo esto puede variar entre regiones así lo demuestra la siguiente investigación realizada en 14 de las 20 regiones de Italia que conforman ese país, donde se ejecutó un análisis de 931 muestras de carne picada tomadas en puntos de venta minoristas y plantas procesadoras; la técnica empleada fue por inmunogenética y luego para el serotipado se empleó el método de PCR, se llegó a aislar 4 (0,43%) cepas E. Coli O 157 con genes de verotoxina, los reportes positivos se concentraron en lugares de la región norte (Conedera et al 2006).

Si bien la bacteria no está presente en todas las regiones de un país como lo indican los estudios, se podría seguir investigando la presencia de la bacteria en las provincias vecinas del austro especialmente de la región costa donde su temperatura es óptima para el desarrollo del patógeno.

Según los estudios antes citados demuestran que la incidencia del microorganismo E.coli Enterohemorrágica es baja tomando en cuenta el número alto de muestras que se analizan y los periodos de tiempo que se toman para la investigación que van entre uno a dos años, de allí que en relación al número de muestras tomadas y enfocado en un solo lugar en la búsqueda del patógeno esta debería ampliarse en más mercados de la localidad y otros puntos de expendio.

La ausencia del microorganismo EHEC O157:H7, no exime a que la carne este expuesta a otro tipo de contaminación y proliferación de microorganismos por la falta de conocimiento y métodos adecuados para la manipulación de los productos cárnicos por parte de los propietarios por lo tanto no garantizan un producto sano e inocuo, de esta forma no se estaría dando cumplimiento a lo que cita la Ley Orgánica Reformatoria a la ley Orgánica del Régimen de la Soberanía Alimentaria que en el artículo 13 de la Constitución de la República declara que *“las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos y que el estado promoverá la soberanía alimentarias”*; tomando como referencia esta ley se ha elaborado un “Instructivo de Buenas Prácticas de Manufactura” dirigido a los dueños de las tercenas con el cual se pretende concienciar la responsabilidad que tienen con la manipulación de los alimentos.

En la técnica aplicada (Neogen ANSR) para la determinación de la bacteria EHEC, cada uno de los tubo de los reactivos ANSR contiene un control positivo interno (ácidos nucleicos de EHEC O157:H7) el mismo que está creado para ser complementarios de un gen concreto en este caso para E coli O157:H7, el control se identificada como SYTO 82 que es

un colorante de ácidos nucleicos permanente que exhibe color tras la unión a los ácidos nucleicos complementarios y se expresa mediante una curva.

Cuando se inicia la reacción NEAR (Reacción amplificada y ruptura del ADN por medio enzimático) del sistema ANSR, el SYTO 82 se intercala (entrelaza) dentro de los ácidos nucleicos del ADN de doble cadena que se empieza a formar, este compuesto tiene propiedades fluorescentes que se pueden atribuir a la curva de control que se muestra en el software. A medida que más SYTO 82 se une al ADN, se observa más fluorescencia de esta manera se garantiza la correcta operatividad del equipo y del patrón interno.

Incluso en ausencia del gen target (E coli O157:H7), los primers (iniciadores / precursores) en el kit forman enlaces complementarios que permiten que el SYTO 82 siga intercalando (BIND) y formando una curva de crecimiento en el software, esto ocurrirá incluso si la prueba es negativa para el organismo target.

Sin curva de control en una prueba (una línea plana) esto dará lugar a un resultado no válido y por lo general puede ser atribuido a interferencias de la matriz.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en la presente investigación en la determinación de Escherichia Coli O157:H7 (EHEC) en la carne molida que se vende en el mercado el Arenal de la ciudad de Cuenca se puede concluir:

Se analizaron 78 muestras de carne molida en tres diferentes días de la semana las cuales el 100% resultaron negativas para E.coli O157:H7.

Debido a la incorrecta manipulación y por las condiciones higiénicas sanitarias en las que se encuentran algunos establecimientos no se descarta que la carne pueda estar contaminada por otros microorganismos patógenos como podría ser la listeria dada su gran capacidad para crecer a temperaturas refrigeradas.

Con la finalidad de prevenir se elaboró un instructivo de Buenas Prácticas mismo que fue socializado (ANEXO 10).

Se logró establecer un compromiso interinstitucional entre las entidades Ilustre Municipio de Cuenca (Administración del Mercado el Arenal) y la Agencia Nacional de Control y Vigilancia Sanitaria (Coordinación Zonal 6), con el fin de promover las capacitaciones dirigidas a los propietarios y empleados de las tercenas que manipulan alimentos en el mercado el Arenal, para esto se estableció un calendario en el cual se incluye temas como transporte de carne, almacenamiento de alimentos, manipulación de alimentos, limpieza y desinfección (ANEXO 10).

Se dio a conocer los resultados obtenidos a la Dirección Administrativa del Mercado y a su vez se dejaron algunas recomendaciones de mejora en lo que es infraestructura de los puntos de expendio, realizar una vigilancias más continua al personal que manipula los alimentos, insistir en el uso de uniformes entre otros.

BIBLIOGRAFÍA

- ARGUELLO J (2010) *Evaluación del efecto antimicrobiano del lactato de sodio en la conservación de la carne molida de res*. Tesis de grado previo a la obtención del título de Licenciada en Gestión de Gastronomía Escuela Politécnica de Chimborazo. Riobamba Ecuador.
- AGUILAR-BAROJAS, S. (2005). *Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud*. Salud en Tabasco, 11(1-2), 333-8
- BUÑAY, J., & Vicente, L. (2015). *Determinación de Escherichia Coli en carne molida comercializada en los Mercados Municipales: José Mascote, Oeste y 4 Manzanas de la ciudad de Guayaquil*, 2014.
- CICUTA, M. E., Deza, N., Ribón, W. R., & Benitez, M. C. (2006). *Escherichia coli productor de toxina Shiga en medias reses y carnes molidas bovinas*. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.
- CE. 2000b. *Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on Food-Borne Zoonoses*. 12 abril 2000. Disponible en: <http://europa.eu.int/>
- CONEDERA, G., Dalvit, P., Martini, M., Galiero, G., Gramaglia, M., Goffredo, E. & Pezzotti, G. (2004). *Verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 in minced beef and dairy products in Italy*. International Journal of Food Microbiology, 96(1), 67-73.
- DOYLE, M. (2001). *"Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras"*. Editorial Acibia S.A. Zaragoza, España.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. Second Edition. [Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) pp.76, 77]. 2012.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización NTE INEN 2 346:2010: 1(R) *Carne y menudencias comestibles de animales de abasto. Requisitos*. Quito, Ecuador.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización NTE INEN 1 346:2010: 1(R) *Carne y productos cárnicos. Carne molida. Requisitos*. Quito, Ecuador.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización NTE INEN 1529-2:2013 1(R) *Control microbiológico de los alimentos, toma de muestra para el análisis microbiológico*. Quito, Ecuador.
- JURE M, Condori M, Pérez G, Catalán M, López A, Zolezzi G, Chinen I, Matsa Rivas M, Castillo M, (2015). *Aislamiento y caracterización de Escherichia coli O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán*. Revista Argentina de Microbiología; 47(2):125-131.
- LLORT, A. G., Díaz, J. C., Cots, J. V., Santandreu, A. V., García, Y. J., Rico, A. P., & Capella, M. S. (2008, October). *Síndrome hemolítico-urémico*. Revisión de 58 casos. In *Anales de Pediatría* (Vol. 69, No. 4, pp. 297-303). Elsevier Doyma.
- MADIGAN, M.T (2003) *Brock Biología de los microorganismos* 10a ed. Madrid, Pearson Prentice Hall 1096p.
- M.R. Adams y M.O. Moss. (2005), *Food Microbiology*, Guildford UK, The Royal Society of Chemistry
- MEDIN S, Medin R, RossotiD, Siskin D (2015) *Alimentos Seguros: Manipulación* 2a ed Buenos Aires Argentina. Turística.
- MERCADO EC, Gioffre A, Rodríguez SM, Cataldi A, Irino K, Elizondo AM y Ke/Merf 5/*ec/Dw Vet Public Health* 5\: 82-88. AL, Romano MI, Malena R, Méndez MA. 2004. Non-O157 Shiga-toxin producing, Cipolla *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in Argentina.

NEOGEN Corporation. (2013). *ANSR brochure en Español*. Canadá.

ORREGO C. (2003). *Procesamiento de alimentos*, 1era ed., Colombia 148p.

PALMEIRA P, Carbonare SB, Amaral JA, Tino-De-Franco M, et al. *Colostrum from healthy Brazilian women inhibits adhesion and contains IgA antibodies reactive with Shiga toxin-producing Escherichia coli*. *Eur J Pediatr* 2005; 164:37–43.

PRESCOTT L, Harley J, Klein D (2004) *Microbiología* 5a ed., España Mc Graw Hill Interamericana de España, S.A.U 1056 cap 41

RAY, B., & Bhunia, A. (2007). *Fundamental food microbiology*. 4ª ed Editorial Mc Graw Hill New York.211-212.

RIVAS M, Leotta G, Chinen I. (2008) *Manual de procedimientos: Diagnóstico y Caracterización de Escherichia Coli 0157:H7 productor de toxina Shiga a partir de alimentos (en línea)*. Consultado 29 sep. De 2012. Disponible en <http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=TwcRc9zNKIk%3D&tabid=783&mid=1713language=en-US>.

ROLDÁN, M. L., Chinen, I., Otero, J. L., Miliwebsky, E. S., Alfaro, N., Burns, P., & Rivas, M. (2007). *Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de Escherichia coli O157: H7 a partir de productos cárnicos y leche*. *Rev. Argent Microbiol*, 39(2), 113-119.

SANCHEZ J, Serrano S, Marfil R, Jodral M (2009) *Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de Porcino (Fundamentos de Seguridad Alimentaria)* España. Díaz de Santos.

TRUEBA, G., Garcés, V., Colman, R. E., Seymour, M., Vogler, A. J., & Keim, P. (2013). *Escherichia coli O157: H7 in Ecuador: animal reservoirs, yet no human disease*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(5), 295-298.

YI, Y., Ma, Y., Gao, F., Mao, X., Peng, H., Feng, Y., & Zeng, H. (2010). Crystal structure of EHEC intimin: insights into the complementarity between EPEC and EHEC. *PloS one*, 5(12), e15285.

ANEXOS

Anexo 1 Norma INEN Control microbiológico de los alimentos. toma, envío y preparación de muestras para el análisis.



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 2 346:2010
Primera revisión

CARNE Y MENUDENCIAS COMESTIBLES DE ANIMALES DE ABASTO. REQUISITOS.

Primera Edición

MEAT AND EATABLE VISCERA. REQUIREMENTS.

First Edition

DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, carne y productos cárnicos, menudencias comestibles frescas, requisitos.
AL 03.02-413
CDU: 637.5
CIU : 3111
ICS: 67.120.10

CDU: 637.5
ICS: 67.120.10



CIU: 3111
AL 03.02-413

<p>Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria</p>	<p>CARNE Y MENUDENCIAS COMESTIBLES DE ANIMALES DE ABASTO. REQUISITOS.</p>	<p>NTE INEN 2 346:2010 Primera revisión 2010-01</p>
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece los requisitos que deben cumplir la carne y las menudencias comestibles de animales de abasto.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 Esta norma se aplica a la carne y a las menudencias comestibles frescas y congeladas de animales de abasto destinados a consumo humano en puntos de comercialización.</p> <p style="text-align: center;">3. DEFINICIONES</p> <p>3.1 Para los efectos de esta norma se adoptan las siguientes definiciones:</p> <p>3.1.1 <i>Animales de abasto o para consumo humano.</i> Son las especies animales destinadas para consumo humano, criados bajo controles veterinarios y/o zootécnicos debidamente comprobados, sacrificados técnicamente en plantas de faenamiento autorizados; incluye a los bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, camélidos y por extensión a las aves de corral, cobayos, conejos y otras especies permitidas por la autoridad competente.</p> <p>3.1.2 <i>Carne.</i> Tejido muscular estriado en fase posterior a su rigidez cadavérica (post – rigor), comestible, sano y limpio, de animales de abasto que mediante la inspección veterinaria oficial antes y después del faenamiento son declarados aptos para consumo humano. Además se considera carne el diafragma y músculos maceteros de cerdo, no así los demás subproductos de origen animal.</p> <p>3.1.3 <i>Canal (carcasa).</i> Es el cuerpo del animal faenado, desangrado, eviscerado, sin genitales y en las hembras sin ubres; de acuerdo a la especie animal con o sin cabeza, piel, patas, diafragma y médula espinal.</p> <p>3.1.3.1 <i>Canal de bovino.</i> Cuerpo del animal desangrado al cual se le han retirado durante su faenamiento (beneficio) la cabeza, piel o cuero, las manos, patas y vísceras.</p> <p>3.1.3.2 <i>Canal de porcino.</i> Cuerpo del animal desangrado al cual se le han retirado durante su faenamiento (beneficio) las vísceras, con o sin riñón.</p> <p>3.1.3.3 <i>Canal de aves de corral.</i> Cuerpo del animal, desangrado y desplumado al cual se le han retirado durante su faenamiento (beneficio) las patas, el cuello, cabeza y vísceras.</p> <p>3.1.4 <i>Media canal.</i> Es cada una de las dos partes resultantes de dividir la canal, lo más próximo posible a la línea media de la columna vertebral, sin médula espinal.</p> <p>3.1.5 <i>Cuartos de canal.</i> Son las partes producto del seccionamiento transversal de las medias canales a través del quinto al séptimo espacio intercostal.</p> <p>3.1.6 <i>Cortes primarios.</i> Los cortes primarios son los brazos, piernas, chuletero y costillar.</p> <p>3.1.7 <i>Cortes secundarios.</i> Son los cortes con o sin hueso, obtenidos a partir de los cortes primarios, tales como: pulpas, salón, lomos, chuleta, etc.</p> <p>3.1.8 <i>Faenamiento.</i> Es todo el proceso desde que el animal en pie ingresa a la planta de faenamiento hasta su pesaje en canales.</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p>		
<p>DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, carne y productos cárnicos, menudencias comestibles frescas, requisitos.</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN – Casilla 17-01-3999 – Baquerizo Moreno EB-29 y Almagro – Quito-Ecuador – Prohibida la reproducción

3.1.9 Plantas de faenamiento (Matadero). Todo establecimiento registrado y aprobado por la autoridad competente, utilizado para el sacrificio de animales destinados al consumo humano.

3.1.10 Carne fresca. Es la definida en 3.1.2 sometida a refrigeración (entre 0 °C y 4°C en el centro del corte) y que conserva sus características naturales.

3.1.11 Carne congelada. Es la carne que en el centro del corte alcanza y se mantiene a una temperatura inferior a -18°C.

3.1.12 Carne madurada de bovino. Es la carne que luego del faenamiento y de alcanzado el rigor mortis, es almacenada entre 0°C y 7°C como mínimo siete días, para permitir la resolución del rigor, condición en las que adquiere características especiales de color, aroma, sabor y textura.

3.1.13 Carne no apta para el consumo humano. Es la carne procedente de animales con enfermedades zoonóticas, en estado de descomposición, en las cuales es evidente la alteración de sus características organolépticas (color, olor, consistencia), igualmente aquellas contaminadas por microorganismos, parásitos, insectos, larvas; también la procedente de nonatos (fetos) o la tratada con colorantes, sustancias antisépticas, hormonas y otras alteraciones verificadas mediante las disposiciones legales vigentes.

3.1.14 Carne magra. Es aquella que se le retira el tejido adiposo superficial y con poca grasa intramuscular.

3.1.15 Carne grasa (gorda). Es aquella carne que contiene abundante tejido adiposo visible.

3.1.16 Carne pálida, suave y exudativa (PSE). En la condición PSE el pH baja bruscamente y se mantiene por debajo de 5,5 debido a la transformación rápida del glucógeno en ácido láctico; es pálida, suave y exudativa debido a la desnaturalización de las proteínas musculares que pierden su capacidad de retención de agua.

3.1.17 Carne oscura, firme y seca (DFD). En la condición DFD el pH está entre 5,8 y 6,5 debido a los bajos contenidos de glucógeno al momento del faenamiento; es más oscura, es dura y más sensible a la contaminación bacteriana.

3.1.18 Grasa. Tejido adiposo comestible de los animales de abasto.

3.1.19 Menudencias (visceras). Subproductos de origen animal comestibles constituidos por los órganos torácicos y abdominales y se clasifican en:

a) *Menudencias (Visceras) blancas.* Conjunto de componentes del tracto digestivo, páncreas, estómagos e intestinos (tripas naturales), excepto de las aves.

b) *Menudencias (Visceras) rojas.* Corazón, lengua, hígado excluyendo la vesícula biliar, pulmón excluyendo el de las aves de corral, riñones, bazo, molleja limpia sin cutícula.

4. DISPOSICIONES GENERALES

4.1 Los animales que ingresan a las plantas de faenamiento deben tener la guía de movilización y comprobar su estado de salud con los Registros (historias) de salud, cumplir con el Reglamento de Buenas Prácticas Pecuarias; la alimentación de estos animales no debe incluir a nutrientes provenientes de rumiantes y el transporte desde los centros de producción debe hacerse en condiciones que aseguren el bienestar animal.

4.2 Se debe verificar el estado de salud de todos los animales que ingresan a la planta de faenamiento (matadero); la verificación se la debe realizar en base de los documentos, registros veterinarios y/o zootécnicos de los centros de producción (fincas de crianza) y a la inspección veterinaria en pie (inspección ante mortem).

4.3 Antes de ser sometidos a faenamiento el animal debe haber permanecido en reposo (el tiempo de reposo depende de la especie animal) para eliminar el mayor contenido fecal.

(Continúa)

4.4 Las operaciones y prácticas de manipulación, matanza, faenamiento, elaboración posterior y distribución deben garantizar la aplicación del Reglamento de buenas prácticas de manufactura para alimentos procesados.

4.5 El faenamiento debe realizarse en establecimientos destinados para esos efectos, que cuenten con la infraestructura necesaria para evitar la contaminación de la carne y que cumplan con las disposiciones de la Ley de mataderos.

4.6 Las canales y las menudencias antes de salir de las plantas de faenamiento deben pasar la inspección post mortem, para ser declarados aptos para consumo humano.

4.7 La carne y las menudencias comestibles deben mantenerse bajo cadena de frío desde la planta de faenamiento hasta su expendio.

4.8 A más de estas disposiciones, la carne y las menudencias comestibles, deben cumplir con todas las otras estipuladas en la Leyes nacionales que se apliquen (Ley de Mataderos y su Reglamento, Ley Orgánica de la Salud y su Reglamento).

4.9 La conservación de la carne a temperatura superior a la de congelación (-18°C) reduce el tiempo de vida útil del producto.

5. REQUISITOS

5.1 Requisitos específicos

5.1.1 Al examen organoléptico, la carne y las menudencias comestibles deben tener color, consistencia, olores propios y características del producto.

5.1.2 No deben contener residuos de plaguicidas en cantidades superiores a las permitidas en el Codex Alimentarius (CAC/MRL 1-2001).

5.1.3 No deben contener residuos de medicamentos veterinarios en cantidades superiores a las permitidas en el Codex Alimentarius (CAC/MRL 2-2008).

5.1.4 La carne y las menudencias comestibles deben mantenerse en refrigeración o congelación durante su transporte, almacenamiento y expendio.

5.1.5 Sólo se podrá comercializar la carne y las menudencias comestibles que hayan sido aprobadas como aptas para consumo humano en el examen post mortem y de calidad.

5.1.6 El pH de la carne debe estar en rangos de $> 5,5$ y $\leq 7,0$ (ver NTE INEN 783)

5.1.7 La carne y las menudencias comestibles deben cumplir con los requisitos microbiológicos indicados en la tabla 1.

TABLA 1. Requisitos microbiológicos para la carne, aves y sus menudencias comestibles

	n	c	m	M	Método de ensayo
Aerobios mesófilos ufc/g	5	3	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	NTE INEN 1 529-5
<i>Escherichia coli</i> ufc/g	5	2	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	NTE INEN 1 529-8
<i>Staphylococcus aureus</i> ufc/g	5	1	$1,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	NTE INEN 1 529-14
Clostridium sulfito reductores ufc/g	5	1	$3,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	NTE INEN 1 529-18
Salmonella/ 25 g	5	---	AUSENCIA	---	NTE INEN 1 529-15

(Continúa)

Donde:

- n = número de unidades de la muestra
- c = número de unidades defectuosas que se acepta
- m = nivel de aceptación
- M = nivel de rechazo

6. INSPECCIÓN

6.1 Muestreo

6.1.1 El muestreo a nivel de plantas de faenamiento (mataderos) debe realizarse en las canales, con el método de hisopado, en un área mínima de 100 cm², en tres puntos.

6.1.2 El muestreo a nivel de expendio se debe realizar de acuerdo con las NTE INEN 776, NTE INEN 1 529-2 y NTE INEN -ISO 2859-1

6.2 Criterios de aceptación y rechazo

6.2.1 Si la muestra ensayada no cumple con uno o más de los requisitos indicados en esta norma, se rechazará el lote.

7. ROTULADO

7.1 Cuando la carne y las menudencias comestibles se expendan empacados, deben cumplir con los requisitos que se establece en el artículo 14 de la Ley orgánica de Defensa al consumidor y en el RTE INEN 022.

7.2 Se debe indicar claramente la manera de conservar el producto (refrigeración o congelación)

(Continúa)

APENDICE Z**Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR**

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 776	<i>Carne y Productos cárnicos. Muestreo</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 783	<i>Carne y productos cárnicos. Determinación del pH</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-2	<i>Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-5	<i>Control microbiológico de los alimentos. Determinación del número de microorganismos aeróbicos mesófilos REP</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-8	<i>Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y escherichia coli.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-14	<i>Control microbiológico de los alimentos. Determinación del número de Staphylococcus aureus.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-15	<i>Control microbiológico de los alimentos. Salmonella método de detección.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-18	<i>Control microbiológico de los alimentos. Clostridium perfringens. Recuento en tubo por siembra en masa.</i>
NTE INEN-ISO 2859-1:	<i>Procedimientos de muestreo para inspección por atributos. Parte 1. Programas de muestreo clasificados por el nivel aceptable de calidad (AQL) para inspección lote a lote</i>
RTE INEN 022	<i>Reglamento técnico Ecuatoriano. Rotulado de productos alimenticios procesados, envasados y empacados. Requisitos</i>
Codex Alimentario CAC/MRL 1-2001	<i>Lista de Límites Máximos para Residuos de Plaguicidas</i>
Codex Alimentario CAC/LMR 02-2008	<i>Lista de Límites Máximos para Residuos de Medicamentos Veterinarios</i>
Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura	<i>para alimentos procesados Decreto Ejecutivo 3253, Registro Oficial 696 de 4 de Noviembre del 2002.</i>
Ley de Mataderos.	<i>Decreto Supremo No. 502 expedido el 10 de marzo de 1964. Registro Oficial No. 221 de 7de abril de 1964.</i>
Reforma a la Ley de Mataderos.	<i>Decreto Supremo No. 407 expedido el 3 de Junio de 1966. Registro Oficial No. 52 del 10 de Junio de 1966.</i>
Reglamento a la Ley de Mataderos	<i>Decreto Ejecutivo No. 3873 expedido el 5 de Junio de 1996. Registro Oficial No. 964 del 11 de Junio de 1996.</i>
Ley Orgánica de Defensa del Consumidor	<i>Ley No. 21 de 4 de julio del 2000 y publicado en el Registro Oficial No. 116 de 10 de julio del 2000.</i>
Ley Orgánica de la Salud	<i>Ley No. 2006-67 de 22 de diciembre del 2006, publicado en el suplemento de Registro Oficial No. 423</i>
Reglamento de alimentos	<i>Decreto Ejecutivo 4114 Publicado en el Registro Oficial 984 del 22 de julio de 1988</i>

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1217:2006 *Carne y productos cárnicos. Definiciones* Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito, 2006.

(Continúa)

Norma Técnica Colombiana NTC 1325 (quinta actualización) *Industrias Alimentarias. Productos cárnicos procesados no enlatados*. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Santa Fé de Bogotá, xxx.

Comisión del Codex Alimentario CAC/RCP 58/2005 *Código de prácticas de Higiene para la Carne*

Comisión del Codex Alimentario CAC/ GL-21 1997 *Principios para el establecimiento y la aplicación de criterios microbiológicos para los alimentos*

Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comisión del Codex Alimentario. *Código internacional recomendado para la inspección de matanza y para el dictamen ante-mortem y post-mortem sobre animales de matanza y carnes*. CAC/RCP 41-1993

Código Alimentario Argentino Capítulo Capítulo VI Alimentos cárnicos y afines carnes de consumo frescas y envasadas, 2005-08

International Commission on Microbiological Specifications for Foods ICMSF *Microorganisms in Foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. 2nd Ed. 1986

A. MADRID, J. M. CENZANO, *Manual de legislación de la carne y de los productos cárnicos*. AMV Ediciones, Mundi prensa, 2002

Ley de Mataderos del Ecuador. Decreto Supremo No. 502 expedido el 10 de marzo de 1964. Registro Oficial No. 221 de 7 de abril de 1964.

Reforma a la Ley de Mataderos del Ecuador. Decreto Supremo No. 407 expedido el 3 de Junio de 1966. Registro Oficial No. 52 del 10 de Junio de 1966.

Reglamento a la Ley de Mataderos del Ecuador. Decreto Ejecutivo No. 3873 expedido el 5 de Junio de 1996. Registro Oficial No. 964 del 11 de Junio de 1996

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Documento: NTE INEN 2 346 **TÍTULO:** CARNE Y MENUDENCIAS COMESTIBLES DE ANIMALES DE ABASTO. REQUISITOS **Código:** AL 03.02-413
Primera revisión

ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio:	REVISIÓN: Fecha de aprobación anterior por Consejo Directivo 2005-10-26 Oficialización con el Carácter de VOLUNTARIA por Acuerdo No. 06-005 de 2006-01-02 publicado en el Registro Oficial No. 188 de 2006-01-16 Fecha de iniciación del estudio: 2008-03
--	---

Fechas de consulta pública: de _____ a _____

Subcomité Técnico: CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS
 Fecha de iniciación: 2009-05-06 Fecha de aprobación: 2009-07-06
 Integrantes del Subcomité Técnico:

NOMBRES:
 Dr. Aarón Redrovan (Presidente)
 Dra. Elina Arguello
 Ing. Yolanda Lara
 Dra. Luisa Nelly Alemán
 Dr. Hernán Riofrío
 Ing. Carlos Cruz
 Dra. Rosa Rivadeneira
 Ing. César Flores
 Dra. Claudio Sánchez
 Dra. Jimena Raza
 Ing. Verónica García
 Dra. Elizabeth Santos
 Ing. Lucía Sotomayor
 Dra. Loyde Triana

 Ing. María E. Dávalos (Secretaria Técnica)

INSTITUCIÓN REPRESENTADA:
 PRONACA
 PRONACA
 SISTEMA DE ALIMENTOS DEL M.S.P.
 FACULTAD DE VETERINARIA U.C.E.
 UNIDAD METROPOLITANA DE SALUD
 FABRICA JURIS CIA. LTDA.
 INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE, QUITO
 EMBUTIDOS LA ITALIANA
 EMBUTIDOS LA ITALIANA
 FABRICA JURIS CIA. LTDA.
 SISTEMA DE ALIMENTOS M.S.P.
 GRUPO ORO
 FEDERER
 INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE,
 GUAYAQUIL
 INEN - REGIONAL CHIMBORAZO

Otros trámites: Esta NTE INEN 2 346:2010 (Primera Revisión), reemplaza a la NTE INEN 2 346:2006

El Directorio del INEN aprobó este proyecto de norma en sesión de 2009-11-27

Oficializada como: Voluntaria Por Resolución No. 134-2009 de 2009-12-22
 Registro Oficial No. 116 de 2010-01-26

**Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891 - Fax: (593 2) 2 567815
Dirección General: E-Mail: direccion@inen.gov.ec
Área Técnica de Normalización: E-Mail: normalizacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Certificación: E-Mail: certificacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Verificación: E-Mail: verificacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: inencati@inen.gov.ec
Regional Guayas: E-Mail: inenguayas@inen.gov.ec
Regional Azuay: E-Mail: inencuenca@inen.gov.ec
Regional Chimborazo: E-Mail: inenriobamba@inen.gov.ec
URL: www.inen.gov.ec**

Anexo 2: Norma INEN Carne y Productos Cárnicos.Carne Molida.Requisitos.



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 1 346:2010
Primera revisión

CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS. CARNE MOLIDA. REQUISITOS.

Primera Edición

MEAT AND MEAT PRODUCTS. GROUND MEAT. REQUIREMENTS.

First Edition

DESCRIPTORES: Carne y productos cárnicos, carne molida, requisitos.
AL 03.02-411
CDU: 637.5
CIU: 3111
ICS: 67.120.10

CDU: 637.5
ICS: 67.120.10



CIU:3111
AL 03.02-411

<p>Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria</p>	<p>CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS. CARNE MOLIDA. REQUISITOS.</p>	<p>NTE INEN 1 346:2010 Primera revisión 2010-02</p>
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece los requisitos que debe cumplir la carne molida.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 Esta norma se aplica a la carne molida de animales de abasto destinados a consumo humano en puntos de comercialización.</p> <p style="text-align: center;">3. DEFINICIONES</p> <p>3.1 Para efectos de esta norma se aplican las definiciones contempladas en la NTE INEN 2 346 y la que a continuación se detalla:</p> <p>3.1.1 <i>Carne molida.</i> Es la carne apta para el consumo humano, dividida finamente por procedimientos mecánicos y sin aditivo alguno.</p> <p style="text-align: center;">4. CLASIFICACIÓN</p> <p>4.1 De acuerdo con el contenido de grasa la carne molida se clasifica en tres tipo.</p> <p>4.1.1 <i>Tipo I.</i></p> <p>4.1.2 <i>Tipo II.</i></p> <p>4.1.3 <i>Tipo III</i></p> <p style="text-align: center;">5. DISPOSICIONES ESPECÍFICAS</p> <p>5.1 La carne molida debe presentar el color, olor y sabor característicos del producto, y debe estar exenta de cualquier color, olor, sabor y consistencia anormal.</p> <p>5.2 El producto no debe presentar alteraciones causadas por microorganismos o cualquier agente biológico, físico o químico y debe estar exento de materias extrañas.</p> <p>5.3 Todo el equipo que se ponga en contacto con las materias primas y el producto, debe estar limpio y sanitizado.</p> <p style="text-align: center;">6. REQUISITOS</p> <p>6.1 Requisitos específicos</p> <p>6.1.1 La carne que se utilice para carne molida debe cumplir con la NTE INEN 2 346.</p> <p>6.1.2 El proceso de elaboración debe efectuarse aplicando Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y cumplir con lo dispuesto en el Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura para Alimentos Procesados.</p> <p>6.1.3 La carne molida debe estar exenta de sustancias conservantes, colorantes, y cualquier otro aditivo.</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p>		
<p>DESCRIPTORES: Carne y productos cárnicos, carne molida, requisitos.</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN – Casilla 17-01-3999 – Baquerizo Moreno Es-29 y Almagro – Quito-Ecuador – Prohibida la reproducción

6.1.4 El producto no debe contener residuos de plaguicidas o sus metabolitos y Residuos de medicamentos veterinarios en cantidades superiores a los límites máximos establecidos por el Codex Alimentarius (CAC/MRL 1-2001 y CAC/MRL 02-2005).

6.1.5 La carne molida, debe conservarse a nivel de expendio en refrigeración (0°C a 4°C) o en congelación a -18°C.

6.1.6 La carne molida debe cumplir con los requisitos indicados en la tabla 1.

TABLA 1. Requisitos de la carne molida

REQUISITOS	UNIDAD	MIN	MAX	METODO DE ENSAYO
Grasa total				NTE INEN 778
TIPO I	%	-	15	
TIPO II	%	> 15	30	
TIPO III	%	>30	40	

6.1.7 La carne molida debe cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la tabla 2.

TABLA 2. Requisitos microbiológicos para la carne molida

	n	c	m	M	Método de ensayo
Aerobios mesófilos ufc/g	5	3	1,0 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁷	NTE INEN 1 529-5
<i>Escherichia coli</i> ufc/g	5	2	1,0 x 10 ²	1,0 x 10 ³	NTE INEN 1 529-8
<i>Staphylococcus aureus</i> ufc/g	5	1	1,0 x 10 ²	5,0 x 10 ²	NTE INEN 1 529-14
Clostridium sulfito reductores ufc/g	5	1	3,0 x 10 ¹	1,0 x 10 ²	NTE INEN 1 529-18
Salmonella/ 25 g	5		AUSENCIA	---	NTE INEN 1 529-15

7. INSPECCIÓN

7.1 Muestreo

7.1.1 El muestreo a nivel de expendio se realiza de acuerdo con la NTE INEN 776 e NTE INEN-ISO 2859-1.

7.1.2 La toma de muestras para el análisis microbiológico debe realizarse de acuerdo a la NTE INEN 1 529-2.

7.2 Aceptación o rechazo. Se acepta el producto si cumple con los parámetros establecidos en esta norma, caso contrario se rechaza.

8. ROTULADO

8.1 Cuando la carne molida se expenda empacada, debe cumplir con los requisitos establecidos en el RTE INEN 022.

8.1.1 No debe tener leyendas de significado ambiguo, ni descripción de características del producto que no puedan ser comprobadas.

8.2 Se debe indicar claramente la manera de conservar el producto

8.3 En la etiqueta junto al nombre del producto se debe indicar el tipo al que corresponde.

(Continúa)

APENDICE Z**Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR**

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 776	<i>Carne y productos cárnicos. Muestreo para bromatología.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 777	<i>Carne y productos cárnicos. Determinación de la pérdida por calentamiento.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 778	<i>Carne y productos cárnicos. Determinación de la grasa total.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-2	<i>Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-5	<i>Control microbiológico de los alimentos. Determinación del número de microorganismos aeróbicos mesófilos REP</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-8	<i>Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y escherichia coli.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-14	<i>Control microbiológico de los alimentos. Determinación del número de Staphylococcus aureus.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-15	<i>Control microbiológico de los alimentos. Salmonella método de detección.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-18	<i>Control microbiológico de los alimentos. Clostridium perfringens. Recuento en tubo por siembra en masa.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 346	<i>Carne y menudencias comestibles de animales de abasto. Requisitos (1ra. Revisión)</i>
NTE INEN-ISO 2859-1:	<i>Procedimientos de muestreo para inspección por atributos. Parte 1. Programas de muestreo clasificados por el nivel aceptable de calidad (AQL) para inspección lote a lote</i>
RTE INEN 022	<i>Reglamento técnico Ecuatoriano. Rotulado de productos alimenticios procesados, envasados y empacados. Requisitos</i>
Codex Alimentario CAC/MRL 1-2001	<i>Lista de Límites Máximos para Residuos de Plaguicidas</i>
Codex Alimentario CAC/LMR 02-2005	<i>Lista de Límites Máximos para Residuos de Medicamentos Veterinarios</i>
Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura para alimentos procesados Decreto Ejecutivo 3253, Registro Oficial 696 de 4 de Noviembre del 2002.	

Z.2 BASES DE ESTUDIO

- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 346 (1ra Revisión) *Carne y menudencias comestibles de animales de abasto. Requisitos.* Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN. Quito, 2009.
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 217 *Carne y productos cárnicos. Definiciones.* Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN. Quito, 2006.
- Norma Técnica Colombiana NTC 1325 (quinta actualización) Industrias Alimentarias. *Productos cárnicos procesados no enlatados.* Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Santa Fé de Bogotá, xxx.
- Código alimentario Argentino. Capítulo VI Alimentos carneos y afines carnes de consumo frescas y envasadas, Buenos Aires 2005-08.

(Continúa)

Ley Orgánica de la Salud Nro. 2006-67, publicado en el Registro Oficial Nro. 423 del viernes 22 de Diciembre del 2006

Comisión del Codex Alimentario CAC/RCP 58/2005 *Código de prácticas de Higiene para la Carne*

Comisión del Codex Alimentario CAC/ GI-21 1997 *Principios para el establecimiento y la aplicación de criterios microbiológicos para los alimentos*

Comisión del Codex Alimentario CODEX STAN 98-1981 (Rev 1 1991) Norma para la Carne Picada Curada Cocida.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods. ICMSF *Microorganisms in Foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. 2nd Ed. 1986

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Documento: TÍTULO: CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS. CARNE Código: NTE INEN 1 346 MOLIDA. REQUISITOS AL 03.02-111
Primera revisión

ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio:	REVISIÓN: Fecha de aprobación anterior por Consejo Directivo 1985-11-26 Oficialización con el Carácter de OBLIGATORIA por Acuerdo No. 63 de 1986-02-04 publicado en el Registro Oficial No. 376 de 1986-02-17 Fecha de iniciación del estudio: 2008-03
--	--

Fechas de consulta pública: de _____ a _____

Subcomité Técnico: CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS

Fecha de iniciación: 2009-06-24

Fecha de aprobación: 2009-10-14

Integrantes del Subcomité Técnico:

NOMBRES:

Dr. Aarón Redrovan (Presidente)
Ing. Yolanda Lara
Dra. Luisa Nelly Alemán
Dr. Hernán Riofrío
Ing. Carlos Cruz
Dra. Rosa Rivadeneira
Ing. César Flores
Dra. Claudio Sánchez
Ing. Verónica García
Dra. Elizabeth Santos
Ing. Lucía Sotomayor
Dra. Loyde Triana

Ing. María Fernanda Izquierdo
Dra. María Angélica Madera
Ing. Juan Andrés Almeida
Dra. Alexandra Pazmiño
Dr. Mario Perasso
Ing. María E. Dávalos (Secretaria Técnica)

INSTITUCIÓN REPRESENTADA:

PRONACA
SISTEMA DE ALIMENTOS DEL M.S.P.
FACULTAD DE VETERINARIA U.C.E.
UNIDAD METROPOLITANA DE SALUD
FABRICA JURIS CIA. LTDA.
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE, QUITO
EMBUTIDOS LA ITALIANA
EMBUTIDOS LA ITALIANA
SISTEMA DE ALIMENTOS M.S.P.
GRUPO ORO
FEDERER
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE,
GUAYAQUIL
LA EUROPEA
ADIMAQ
COORPORACIÓN LA FAVORITA
SECRETARIA METROPOLITANA DE SALUD
ECARNI S.A.
INEN - REGIONAL CHIMBORAZO

Otros trámites: Esta NTE INEN 1 346:2010 (Primera Revisión), reemplaza a la NTE INEN 1 346:1986

El Directorio del INEN aprobó este proyecto de norma en sesión de 2009-12-18

Oficializada como: OBLIGATORIA
Registro Oficial No. 131 de 2010-02-18

Por Resolución No. 003-2010 de 2010-01-22

**Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891 - Fax: (593 2) 2 567815
Dirección General: E-Mail: direccion@inen.gov.ec
Área Técnica de Normalización: E-Mail: normalizacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Certificación: E-Mail: certificacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Verificación: E-Mail: verificacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: inencati@inen.gov.ec
Regional Guayas: E-Mail: inenguayas@inen.gov.ec
Regional Azuay: E-Mail: inencuenca@inen.gov.ec
Regional Chimborazo: E-Mail: inenriobamba@inen.gov.ec
URL: www.inen.gov.ec**

Anexo 3. Norma INEN Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.



Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 1529-2:2013
Primera revisión

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. TOMA,
ENVÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICO**

Primera edición

MICROBIOLOGICAL CONTROL OF FOODS, SAMPLING, SENDING AND PREPARATION OF TEST SAMPLES FOR MICROBIOLOGICAL EXAMINATION

First edition

DESCRIPTORES: Microbiología de los alimentos, análisis microbiológico, muestras, toma de muestras, envío de muestras, preparación de muestras
AL 01.05-318
CDU: 614.31:579.67:543.05
CIU: 9320
ICS: 07.100.30

Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria	CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS TOMA, ENVÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	NTE INEN 1529-2:2013 Primera revisión 2013-09
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma según la naturaleza del producto, establece los procedimientos generales para la toma de muestras de alimentos, el envío al laboratorio y su preparación en el laboratorio.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 Los procedimientos establecidos en esta norma para la preparación de la muestra se refieren al tratamiento inicial al que se deben someter las muestras de alimento destinadas al análisis microbiológico, según se indica en la serie de NTE "INEN 1529 Control Microbiológico de los Alimentos", excepto en las NTE INEN 1529-1 y 1529-12.</p> <p>2.2 Esta norma no se aplica para casos de brotes epidémicos o intoxicaciones, ni para decidir el tamaño de la muestra</p> <p style="text-align: center;">3. DEFINICIONES</p> <p>3.1 Para los efectos de esta norma se adoptan las definiciones:</p> <p>3.1.1 <i>Lote</i>. Es la cantidad de alimento, grande o pequeña, enviada a un determinado destinatario. Normalmente consiste en numerosas cajas de alimento procedente de uno o más lotes.</p> <p>3.1.2 <i>Partida</i>. Es la cantidad de alimento. Grande o pequeña, enviada a un determinado destinatario. Normalmente consiste en numerosas cajas de alimento procedente de uno o más lotes.</p> <p>3.1.3 <i>Toma de muestras</i>. Es el acto de seleccionar y coger una determinada cantidad, o un número de recipientes o unidades de producción de un mismo lote de alimento, o de áreas de superficie que son o que entran en contacto con productos alimenticios.</p> <p>3.1.4 <i>Unidad de muestreo</i>. Es la parte definible más pequeña de un lote (unidad de producción). Esto puede significar una lata, o un paquete. Cuando la producción es a granel y se envasa en cajas, bidones, barriles, sacos, etc., entonces la unidad de muestreo es arbitraria y puede depender del utensilio para tomar muestras. No se debe confundir esta unidad de muestreo con la unidad de muestra realmente utilizada en análisis.</p> <p>3.1.5 <i>Unidad de muestra</i>. Es la cantidad de material (tomada de la muestra de población) que realmente se utiliza en el análisis, es la unidad analítica. En general, para los ensayos microbiológicos se utiliza una unidad de muestra de 10 ó 25 g ó cm³ o sus múltiplos.</p> <p>3.1.6 <i>Muestra</i>. Parte del conjunto (población) a partir de la cual se trata de estimar, mediante análisis o examen, las propiedades del conjunto. Se debe tener en cuenta que sólo puede someterse a análisis una parte (unidad de muestra) de la muestra de población (ver 3.1.5 y 3.1.7).</p> <p>3.1.7 <i>Muestra de población</i>. Número total (una o más) de unidades de muestreo individuales tomadas de la población (idealmente, obtenidas de una forma aleatoria) que se destinan al análisis de acuerdo con un programa de muestreo determinado (ver nota 1).</p> <p>NOTA 1 La muestra de población y la unidad de muestra pueden ser lo mismo pero, la muestra de población debe ser considerablemente más grande que la unidad de muestra que habrá de analizarse y cada muestra de población proporciona sólo un resultado por cada análisis realizado. Por tanto, si se analiza más de una unidad de muestra de la misma muestra de población, los resultados se promedian.</p> <p style="text-align: right;">(Continúa)</p> <p>DESCRIPTORES: Microbiología de los alimentos, análisis microbiológico, muestras, toma de muestras, envío de muestras, preparación de muestras.</p>		

3.1.8 Muestra selectiva (sesgada). Es la muestra de alimento, tomada para demostrar o documentar las condiciones insatisfactorias observadas por el inspector, o bien, para contar con una unidad del alimento que se sospecha insatisfactorio y someterlo al análisis microbiológico.

3.1.9 Muestra aleatoria. Conjunto de unidades de muestreo elegidas de la población de modo que cada unidad tenga la misma probabilidad de ser seleccionada, con lo que se excluye las subjetividades del que toma las muestras. Normalmente implica la utilización de la tabla de los números aleatorios.

3.1.10 Muestra representativa. Es aquella cuyas características son tan similares como posible a las de la población de la cual proceden.

3.1.11 Programa de muestreo. Es la relación de los criterios de aceptación que se aplicarán a un lote basado en el análisis, por métodos específicos, del número necesario de unidades de muestra.

3.1.12 Programa de atributos. Es el programa de muestreo en que cada unidad de muestra seleccionada se clasifica de acuerdo a las características de calidad del producto y en el que solo hay dos o tres grados de calidad. Por ejemplo: aceptable, rechazable; presente, ausente; aceptable, provisionalmente aceptable, rechazable; recuento bajo, recuento medio, recuento alto (ver nota 2).

3.1.13 Categoría. Serie de factores relacionados con la naturaleza y tratamiento de un alimento, enmarcados en 15 series (1 a 15 categorías), que determina por anticipado el peligro de la presencia de determinadas especies o grupos bacterianos en un alimento.

3.1.14 "n". Número de unidades de muestra de un lote que se deben analizar, para satisfacer las exigencias de un determinado programa de muestreo.

3.1.15 "c". Número máximo aceptable de unidades de muestra que pueden presentar una tasa microbiana comprendida entre "m" y "M". Cuando se encuentra un número superior a "c", se rechaza el lote.

3.1.16 "m". Valor (criterio) microbiológico aceptable de bacterias pro gramo o cm^3 . Los valores superiores a "m" se aceptan provisionalmente o se rechazan.

3.1.17 "M". Valor (criterio) microbiológico utilizado solo en programas de tres clases, para separar la calidad rechazable de la provisionalmente aceptable. En cualquier unidad de muestra, los valores iguales a, o superiores a "M" no son aceptables.

3.1.18 Aceptación-rechazo. La decisión de aceptar o rechazar un lote, en base a un programa de muestreo asociado a un análisis microbiológico determinado, se aplica solo al propósito para el que se realizó dicho análisis (o varios de ellos).

3.1.19 Suspensión inicial (dilución primaria). Es la suspensión, solución o emulsión obtenida después que la cantidad del producto en análisis (o de la porción de muestra preparada para el ensayo) ha sido pesada o medida y luego mezclada, utilizando un homogeneizador cuando es necesario y observando las precauciones apropiadas, con un volumen de diluyente igual a nueve veces la unidad de muestra, para que los microorganismos presentes en la unidad de muestra se distribuyan lo más uniformemente posible y se permita que las partículas grandes, si las hay, se sedimenten (ver nota 3).

3.1.20 Otras diluciones decimales. Las suspensiones, soluciones o emulsiones obtenidas mezclando un volumen específico de la dilución primaria con nueve veces el volumen del diluyente y repitiendo esta operación con cada dilución así preparada, hasta obtener una serie de diluciones decimales adecuada para la inoculación del medio de cultivo.

NOTA 2 En las Normas técnicas Ecuatorianas (NTE) de requisitos se utilizan programas de muestreo por atributos, de dos y tres clases. Un programa de muestreo de dos clases requiere de las siguientes especificaciones: « n », « c » y « m » y los de tres clases: « n », « c », « m » y « M ».

NOTA 3 En algunos casos puede necesitarse, especialmente para productos que dan una suspensión inicial 1+9 demasiado viscosa o demasiado espesa, añadir más diluyente. En algunos otros casos, cuando se necesita relacionar los resultados de los análisis con determinados criterios de especificación puede ser necesario una dilución primaria más concentrada que 1+9. Estos factores deben ser tenidos en cuenta para las operaciones subsiguientes y/o en la expresión de resultados.

(Continúa)

4. INSPECCIÓN

4.1 Muestreo

4.1.1 Disposiciones administrativas (ver nota 4)

4.1.1.1 Se sellará y etiquetará cada muestra. Fijar el sello de manera que sea imposible remover el contenido o la etiqueta sin destruir el sello. Las etiquetas deben ser de tamaño y calidad adecuadas para el propósito (por ejemplo una cartulina de color claro, un cartón a prueba de grasa y de agua y con un ojete reforzado). Escribir la información con tinta indeleble indicando, por lo menos, la naturaleza del producto, el número y código del lote, la fecha de la toma de muestras, el nombre y la firma del agente que tomó las muestras. Cuando sea necesario, se puede incluir información adicional tal como el propósito de la toma de muestras, la masa o volumen de la muestra, la marca de identificación de la unidad (caja, bidón, etc.) de donde se tomó la muestra.

4.1.1.2 Se tomarán todas las muestras, cuando menos, por duplicado y se conservarán en condiciones idénticas a las que tenían en el momento de la toma. De ser necesario, y cuanto antes, se debe poner una serie a disposición de la otra parte. Previo convenio de las partes, se recomienda la toma de series adicionales de muestras, las cuales, en caso necesario, deben guardarse para un arbitraje independiente. Una vez tomadas las muestras, enviar las muestras al laboratorio para su análisis.

4.1.1.3 Las muestras se deben acompañar de un informe de la toma de muestras firmado por el agente responsable de la toma y refrendado por posibles testigos. En el informe debe constar la siguiente información:

- a) Lugar, fecha y hora en que se realizó la toma de muestras.
- b) Nombre y dirección del agente que realizó la toma de muestras y de los posibles testigos.
- c) Método exacto de la toma de muestras (aleatorio en todo el lote, aleatorio en las partes accesibles o por otro método).
- d) Procedimiento exacto utilizado para tomar las muestras, si este difiere de las instrucciones dadas en esta norma.
- e) Motivo de la toma de muestras.
- f) Naturaleza del alimento
- g) Número y código del lote, códigos de los baches y el número y tamaño de las unidades que constituyen el lote.
- h) Tamaño y número de las muestras de la población debidamente identificadas en relación al lote, bache y/o unidad (caja, bidón, etc.) del cual proceden.
- i) Lugar a donde se enviarán las muestras
- j) Ensayos solicitados
- k) Nombre y dirección del laboratorio que analizará las muestras.
- l) Temperatura del producto al momento de la toma de muestras
- m) Origen del envío y lugar de destino.
- n) Si es posible, el nombre y la dirección del fabricante, importador, vendedor o comprador, según proceda.

NOTA 4. Las siguientes instrucciones no son necesariamente aplicables para tomar muestras de rutina.

(Continúa)

- o) Cuando convenga, se debe mencionar en el informe, además, cualquier condición o circunstancia relevante de la toma de muestras (por ejemplo, el estado de los envases y sus alrededores, la temperatura y humedad atmosféricas, la edad del producto, método de esterilización del material para tomar muestras), si la muestra es una mezcla de submuestras y cualquier información especial referente al producto muestreado, por ejemplo, la dificultad para homogeneizar el producto.

4.1.2 Número de muestras de población que se deben tomar

4.1.2.1 Se debe tomar un número de muestras de población equivalente al número "n" de unidades de muestra indicado en el programa de muestreo especificado, ya sea, en las respectivas NTE de requisitos o en un contrato, o según lo acordado entre las partes interesadas o según un programa diseñado para enfrentar una situación emergente (brote de intoxicación, por ejemplo).

4.1.3 Técnicas para la toma de muestras

4.1.3.1 Generalidades

- a) Tomar las muestras en condiciones asépticas, con rapidez pero cuidadosamente, y de tal manera, para que la muestra sea representativa del producto que se quiere analizar.
- b) Antes de abrir un envase limpiar la zona apropiada con agua tibia y jabón y pasar alcohol al 70% sin flamear, o si es un envase de papel, retirar la parte externa. Abrir el envase asépticamente con instrumentos estériles. Para casa envase utilizar un instrumento estéril.
- c) Cuando sea posible, mezclar bien el producto hasta que esté homogeneizado y, cuando no lo es, asépticamente, tomar alícuotas de diferentes sitios del recipiente hasta completar una cantidad no inferior a 100g o cm³.
- d) Si se han de realizar diferentes tipos de análisis (microbiológicos, químicos, físicos y sensoriales), asépticamente tomar primero y por separado las unidades de muestra destinadas al análisis microbiológico. Para conservar estas muestras no se deben utilizar preservantes.
- e) Registrar la temperatura del aire de la sala de almacenamiento o del vehículo, tomar la muestra, luego, insertar el termómetro en el alimento del que se tomó la muestra y registrar su temperatura. Cuando el alimento está envasado en pequeños envases cerrados, registrar la temperatura del alimento en un envase adyacente en la misma caja de cartón o embalaje.
- f) El tamaño de la muestra de población debe ser de 100 cm³ o gramos, mínimo. En muchos casos será el de la unidad de producción del lote como latas herméticamente cerradas conteniendo muchas veces la cantidad del alimento equivalente a la unidad de muestra, o envases muy pequeños de los que se necesitará tomar varios de ellos hasta completar los 100 g.

4.1.4 Recepción y almacenamiento de las muestras en el laboratorio

4.1.4.1 *Chequeo de las condiciones de las muestras.* Al recibir las muestras se debe observar los siguientes aspectos:

- a) *Etiquetado e informe.* Chequear si cada muestra está debidamente sellada, etiquetada y acompañada de una copia del respectivo informe de la toma de muestras (ver 4.1.1.2 y 4.1.1.4).
- a.1) Estado de los envases. Chequear cuidadosamente si el envase tiene defectos, tales como: fisuras, perforaciones, fugas, deformaciones; fracturas y tapas flojas en los de plástico; perforaciones en fundas plásticas.
- a.2) Control de la temperatura. Anotar la temperatura de las muestras perezaderas no congeladas. Las muestras congeladas deben llegar al laboratorio en su estado congelado, controlar si no ha habido congelamiento (ver 5.4.3.3) Las muestras frescas perezaderas deben tener una temperatura entre 0°C a 5°C. Anotar cualquier discrepancia en la hoja de registro.
- a.3) Apego al área de muestreo. Verificar que el número de las muestras de población está conforme con el programa de muestreo utilizado.

(Continúa)

4.1.4.2 Almacenamiento de las muestras. Las muestras deben almacenarse protegidas de cualquier contaminación, de luz solar directa o de otras fuentes de calor y a las temperaturas que se indican:

- a) Productos congelados, a -20°C , máximo hasta siete días.
- b) Productos perecederos no congelados, entre 0°C y 5°C , por no más de 24 horas.
- c) Productos estables: enlatados, productos deshidratados, etc., a temperatura ambiente en lugares secos y frescos, hasta siete días.
- d) Productos misceláneos: enjuagues, hisopos, aguas de efluentes, entre 0°C y 4°C , hasta 12 h.

5. MÉTODO DE ENSAYO

5.1 Fundamento

5.1.1 La toma de muestras debe realizar un agente autorizado o un agente independientemente autorizado que ha recibido formación técnica apropiada. El o la agente debe actuar independientemente y no aceptar la interferencia de terceros. Bajo su responsabilidad puede recibir ayuda de otros. Cuando sea posible, se debe permitir a los delegados de las partes interesadas presenciar la toma de muestras. El agente y su(s) ayudante debe tomar las medidas adecuadas para prevenir cualquier contaminación tanto del envío (o lote(s)) como de las unidades de muestreo (por ejemplo, lavarse y desinfectarse las manos antes de manipular el material a muestrearse, vestir un delantal u overol blanco y limpio, usar mascarilla y gorro, trabajar observando rigurosamente todas las medidas previstas en el programa de la planta para la higiene y desinfección de los empleados).

5.2 Equipo

5.2.1 Equipo para esterilización: autoclave u horno portátil o mechero de alcohol, y un agente desinfectante (alcohol al 70%).

5.2.2 Equipo para mantener muestras: refrigeradora, para almacenar muestras a 2°C y congelador para almacenar a temperaturas menores de -20°C .

5.2.3 Equipo para descongelar muestras: baño de agua controlada termostáticamente con agitador, que opere $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y otro, a $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.2.4 Equipo para homogeneizar muestras: homogeneizadores, trituradores, molinos

5.2.5 Equipo para medir el pH: pH metro con compensación de temperatura y sensibilidad de 0,1 de unidad de pH.

5.2.6 Equipo para pesar muestras: Balanza con exactitud clase II y graduación mínima de 0,1g.

5.2.7 Frigorífico

5.3 Materiales y reactivos

5.3.1 Material: Los materiales utilizados en la toma de muestras deben ser de acero inoxidable u otro material de resistencia adecuada, que no produzca cambios en la muestra que pueden afectar los resultados de los exámenes subsiguientes. El equipo debe ser lo suficientemente robusto para evitar deformaciones en el uso y lo suficientemente leve que permita al operador moverlo en el producto, fácil y rápidamente. Si los utensilios o aparatos son soldados, la suelda debe resistir temperaturas de 180°C . Todas las superficies deben ser lisas y libres de hendiduras, todas las esquinas deben ser redondeadas. El equipo para tomar muestras debe cumplir con los requisitos específicos adecuados a cada producto.

5.3.1.1 Los frascos para muestras y sus cierres, deben ser de un material resistente a esterilizaciones repetidas, inerte, impermeable al agua y a las grasas (acero inoxidable, vidrio y algunos plásticos)

(Continua)

5.3.1.2 También se puede utilizar envases desechables de plástico, hojas de aluminio o fundas plásticas con cierres apropiados. De preferencia deben ser opacos y de capacidad y forma adecuadas para tomar la unidad de muestra deseada. Los frascos para productos sólidos, semisólidos o viscosos deben ser de boca ancha.

5.3.1.3 Todo el material y utensilios utilizados en la toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico deben estar perfectamente limpios, secos, envueltos individualmente y esterilizados por uno de los siguientes métodos físicos:

- a) Vapor a presión de 15 libras/pulgada² (autoclave): 121°C durante 20 min, mínimo.
- b) *Aire caliente*: (170-175) °C, en el punto más frío, durante 1h, mínimo. Utilizar un horno con una eficiente circulación de aire para que haya la seguridad de que en todas las partes del horno se mantiene la temperatura fijada. Si por alguna razón, es imposible la esterilización por estos dos métodos, utilizar los siguientes métodos alternos, que son secundarios, y se los recomienda siempre que el material sea utilizado inmediatamente después de esterilizado y enfriado.
- c) *Vapor fluente*: 100°C por una hora.
- d) *Agua hirviendo*: ebullición en agua por 20 min, mínimo.
- e) Inmersión en etanol al 96% (v/v) y flameado hasta que el etanol se consuma. Para materiales que resisten la llama directa.
- f) Combustión: exponer a la llama de un mechero de Bunsen o de alcohol hasta la incandescencia y enfriar. Para objetos que resistan la incandescencia.

5.3.1.4 Para abrir envases: tijeras, cuchillos, abridores de latas y de botellas, martillos, alicates, destornilladores, herramienta especial para abrir cajas de cartón, bisturíes, etc.

5.3.1.5 Para tomar muestras: sierras; sondas especiales que penetren en el producto y corten un trozo cilíndrico; taladros; cucharas; cucharones de draga; pinzas; tenedores; torundas; plantillas de metal, con un cuadrado de superficie conocida recortado en el centro; fundas plásticas con cierre apropiado; papel aluminio; compuesto obturante, para cerrar los orificios dejados en los quesos al tomar las muestras.

5.3.1.6 Frascos para muestras: frascos de boca ancha con tapa de rosca, envases desechables de plástico. Para el transporte de muestras deben ser de un material que absorba los golpes.

5.3.1.7 Para tomar muestras congeladas: taladro eléctrico de alta velocidad, hacha, cincel.

5.3.1.8 Para controlar la temperatura: Termómetro manual de cuadrante, para controlar la temperatura ambiente y del producto.

5.3.1.9 Para transportar muestras: Refrigeradora portátil capaz de enfriar hasta 0°C a 5°C en poco tiempo. Nevera isotérmica con cierre hermético y material aislante entre la pared interna y la externa, para transportar muestras congeladas o refrigeradas.

5.3.1.10 Para etiquetar: etiquetas y marcadores.

5.3.1.11 Materiales varios: Erlenmeyer, probetas, tubos, pipetas, jeringuillas.

5.3.1.12 Placa de contacto, placas plásticas de 65 mm de diámetro.

5.3.1.13 Hisopo

5.3.1.14 Tela

5.3.2 Diluyentes

5.3.2.1 Agua peptona al 0,1%: para uso general.

5.3.2.2 Agua peptona tamponada: para Salmonella.

5.3.2.3 Agua peptona sal al 15%: para extremadamente halófilos.

5.3.2.4 Agua peptona sal al 5%: para halófilos moderados y halotereantes.

5.3.2.5 Caldo TSB: para revitalización

5.3.2.6 Caldo reforzado para clostridios: para anaerobios.

5.3.2.7 Solución de calgón (hexametáfosfato sódico, $(\text{NaPO}_3)_6$) al 1% en solución Ringer diluida al $\frac{1}{4}$ diluyente para hisopos de alginato.

5.3.2.8 Solución de citrato sódico al 2%, pH $7,5 \pm 0,1$: para quesos, leches fermentadas, leche en polvo "roller".

5.3.2.9 Solución de fosfato dipotásico al 2%: para caseína ácida, caseína láctica y suero ácido en polvo el diluyente debe tener un pH de $8,4 \pm 0,1$ y $7,5 \pm 0,1$ para crema ácida, quesos, caseínatos.

5.3.2.10 Solución de fosfato tripotásico ($\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) AL 8% para ajustar el pH de las muestras.

5.3.2.11 Solución Ringer al $\frac{1}{4}$: para mantequillas

5.3.2.12 Solución de sacarosa al 20% para osmófilos.

5.3.2.13 Solución salina peptonada: para uso general.

5.4 Preparación de la muestra

5.4.1 Generalidades. Implica la preparación en el laboratorio de una sub muestra de modo que sea tan representativa como sea posible de la muestra de población de la cual procede.

5.4.1.1 Si es posible, realizar los ensayos de las muestras luego después de la recepción en el laboratorio. Las muestras deben manipularse asépticamente y de preferencia sin interrupciones, si éstas son inevitables, debe ser lo más cortas posible y el producto se debe mantener en refrigeración durante este periodo.

5.4.1.2 Antes de manipular la muestra limpiar el área de trabajo y sus proximidades, e inmediatamente desinfectar el área con etanol al 70% o con cualquier otro desinfectante.

5.4.1.3 En muchos casos la unidad de muestreo, sin preparación adicional alguna, puede utilizarse como unidad de muestra. Si se necesita mezclar dos o más unidades de muestreo para tomar la unidad de muestra, transferir las unidades de muestreo a un recipiente estéril suficientemente grande y mezclar bien.

5.4.1.4 Antes de abrir cualquier envase, sean éstos rígidos o semirrígidos, limpiar externamente el envase con jabón o detergente y agua, secarlos con papel toalla y, en las proximidades de la tapa o en área donde se va a abrir el envase flamear (con o sin etanol al 70% *v/v* evitando sobrecalentamientos) o aplicar una mezcla desinfectante que se le deja secar sin aplicar calor; sin embargo, cuando el envase o el material del embalaje es muy delgado y no resiste el proceso de limpieza omitir este paso y desinfectar con mucho cuidado. Cuando el envase puede removerse sin riesgo alguno de contaminar el producto, entonces, la limpieza y desinfección del envase no son necesarias. Todas las manipulaciones, durante y después de la abertura deben realizarse en condiciones tan asépticas como posible y de preferencia sin interrupciones; utilizar una cámara de flujo laminar vertical, si es posible. Durante cualquier interrupción se debe mantener el producto bajo refrigeración. El intervalo entre la agitación de la muestra y la remoción de la unidad analítica no debe ser mayor de tres minutos, y se debe tener cuidado para eliminar, incluso, cualquier espuma de la unidad analítica.

5.4.1.5 Abrir los envases de lata por la tapa no codificada, cuidando de no dañar el doble cierre.

5.4.1.6 Al tomar muestras de latas abombadas deben observarse las siguientes precauciones a fin de disminuir la salida violenta del contenido:

5.4.1.7 Abrir las latas abombadas en sitios especiales y NUNCA deben abrirse en áreas destinadas a pruebas de esterilidad.

5.4.4.8 Antes de abrir, refrigerar la lata lavada y seca.

(Continua)

5.4.1.9 Colocar la lata en una bandeja poco profunda que contenga una mezcla desinfectante, ver NTE INEN 1529-1. Si se sospecha la presencia de *Clostridium botulinum*, la bandeja debe contener una solución saturada de carbonato de sodio.

5.4.1.10 Desinfectar la lata frotando una mezcla desinfectante y dejando secarse, pero, NUNCA aplicando calor.

5.4.1.11 Para tapar la lata, utilizar un embudo de vidrio que tenga el vástago largo y firmemente taponado con algodón hidrófilo, a través del cual pasa una varilla de acero con su extremidad inferior afilada (todo el aparato debe estar envuelto y esterilizado). Cubrir la lata con el embudo y sobre la tapa de ésta hacer descansar el extremo afilado de la varilla, y luego, cuidadosamente, golpear la varilla.

5.4.1.12 Abrir la lata después que la presión ha descendido, y según proceda, continuar con uno de los procedimientos indicados a continuación:

5.5 Procedimientos

5.5.1 Procedimiento para toma de muestras

5.5.1.1 Las mantecas, margarinas, mantequillas que se encuentren en unidades de 250 o más g, dividir las en cuatro partes y tomar como muestras las dos cuartas partes opuestas. Si la unidad pesa menos de 250 g, tomar toda la unidad.

5.5.1.2 De los quesos pequeños y de las porciones de queso envueltas y empacadas en envases pequeños tomar como muestra un queso completo y de las porciones, un número suficiente de ellas para que la muestra no sea inferior a 100g.

5.5.1.3 Productos a granel (bidones, tambores, etc.).

a) Productos líquidos

a.1) Evitando contaminar el contenido, mezclar los productos líquidos cuidadosamente con un cucharón estéril o mecánicamente, hasta que el producto esté totalmente mezclado; inmediatamente después de la mezcla, con un cucharón estéril y asépticamente transferir a un envase estéril una cantidad no inferior a 100 cm³. Si es difícil obtener una buena homogeneización, de sitios apropiados del recipiente tomar varias sub muestras de manera a obtener una muestra no inferior a 100 cm³ y que sea representativa del envase. Inmediatamente cerrar y etiquetar el frasco. Para tomar una muestra de un ducto de salida, primero dejar pasar las primeras fracciones del producto para limpiar la salida con el flujo y luego tomar la muestra, no menos de 100 cm³.

a.2) En el caso de cremas, dar un número suficiente de golpes con el cucharón para asegurar una buena mezcla, sumergir el cucharón moviendo de un lado para otro con mucho cuidado para evitar la formación de espuma y de mantequilla. Tomar no menos de 100 cm³ de muestra.

a.3) En el caso de leche condensada y evaporada mezclar muy cuidadosamente adherido a las paredes y al fondo del recipiente. Del contenido mezclado, trasladar de 2 a 3 litros a un recipiente más pequeño y agitarlo. Tomar no menos de 100 cm³ de muestra.

b) Productos sólidos

b.1) En el caso de productos sólidos, cuando la capa superficial no hace parte de la muestra, retirarla del área de muestreo con una espátula, cuchillo o cuchara estériles, hasta no menos 5mm de profundidad y tomar la muestra con otro instrumento estéril. Si el producto es un polvo, la capa superficial se retira antes de mezclar. Si el alimento está formado por capas o extractos, separadamente y evitando contaminar las partes tomar muestras de cada una en la misma proporción en que se encuentran en el producto original.

b.2) En el caso de mantecas, margarina, mantequillas a granel y el producto está en el bloque, y para que la muestra no sea inferior a 100 g, realizar dos sondajes o más introduciendo una sonda verticalmente en el centro del bloque. Si el producto se encuentra en barriles, insertar la sonda diagonalmente a través de la masa del producto desde el borde del barril sin que penetre en la superficie del fondo. En los dos casos, hacer girar la sonda una vuelta completa y retirar el material por completo. Sostener la punta de la sonda encima de la abertura del frasco estéril, y con un cuchillo o espátula transferir inmediatamente la muestra de la sonda en pedazos de aproximadamente 75 mm. Dejar una porción de aproximadamente 25 mm o más de largo para obturar el agujero dejado por la sonda. No permitir que estos productos entren en contacto con papel o superficies absorbentes (porcelana) del agua o grasa. Los productos congelados hasta el punto de resistir la presión de la sonda deben ser ablandados manteniéndolos por 24h a 10°C.

5.5.1.4 Productos a granel congelados. Para muestrear estos productos utilizar brocas, saca bocados y otros instrumentos cortantes estériles. Los productos congelados deben mantenerse en su estado congelado hasta su llegada al laboratorio (ver 5.5.2.7). Se debe evitar descongelar y congelar nuevamente la muestra.

a) La toma de muestras de piezas o bloques de alimentos de gran tamaño se puede realizar de la siguiente manera: sobre el alimento asegurar, con la copa hacia arriba, un embudo plástico estéril con el vástago recortado por donde se introduce la broca estéril de un taladro. Las virutas del alimento son conducidas a la superficie y se acumulan en la copa del embudo. Transferir estas virutas a un frasco estéril para muestras. Inmediatamente identificar la muestra y acondicionarla para su envío al laboratorio.

5.5.1.5 Toma de muestras de superficies vivas. Utilizando un hisopo humedecido, frotar la superficie de la palma de una mano, la superficie interna de los dedos y de las uñas (ver 5.5.1.8 literal b.1). También se puede realizar mediante la técnica del lavado: colocar la mano dentro de una funda plástica, verter 50 cm³ de diluyente y frotar con el líquido las palmas, entre los dedos y uñas.

5.5.1.6 *Toma de muestras de superficies inertes.*

a) Botellas, envases, recipientes, utensilios pueden muestrearse mediante lavado, y si es posible, con hisopo) (ver 5.5.1.8 literal b.1). Prestar especial atención a la porción de los utensilios que se introduce en la boca, por ejemplo, borde superior interno y externo de copas y vasos, porción cóncava de cucharas, etc. De los platos, la parte que en contacto con los alimentos.

b) La toma de muestras de superficies lisas puede realizarse con hisopo (ver 5.5.1.8 literal b.1) o con cilindros de agar. El cilindro de agar es un medio de agar estéril solidificado dentro de un tubo plástico estéril. Asépticamente, cortar uno de los extremos del cilindro, presionar la superficie de agar descubierta contra la superficie en estudio, con un escapelo estéril cortar una rodaja y colocarla en una placa Petri, con la superficie sembrada hacia arriba. Identificar la muestra.

c) Las superficies lisas también se pueden muestrear utilizando un portaobjeto (ver 5.5.1.8 literal b.3).

d) Después de sacarla desde el contenedor en que se traslada, presionar firmemente la superficie de agar de la placa de contacto o del portaobjeto sobre la superficie a ensayar sin movimiento lateral. En la literatura se señala que para placas de contacto los resultados óptimos se obtienen con un tiempo de contacto de 10 s y una presión obtenida con una masa de 500 g. Cerrar las placas de contacto o portaobjetos inmediatamente después de la inoculación y colocarlos dentro de la caja isotérmica.

5.5.1.7 *Toma de muestras destinadas al análisis de bacterias anaerobias.* Evitar que las muestras que contienen bacterias anaerobias entren en contacto con el aire, por ejemplo, de los tejidos profundos no tomar muestras pequeñas: Si esto no es posible y si se utilizan hisopos, humedecer el hisopo en el medio de transporte de Stuart (medio reducido), ver NTE INEN 1529 1 y una vez tomada la muestra, colocar el hisopo en un tubo que contenga este medio.

5.5.1.8 Otros

Quesos grandes. En el caso de quesos grandes tomar de las diferentes partes suficientes sub muestras, hasta completar una muestra de por lo menos 100 g. De los maduros, retirar la envoltura externa y dejar intacta la interna (costra, cera, películas plásticas o de tela en los quesos sin corteza). Dependiendo de la forma, la masa, el tipo y el grado de madurez del queso, utilizar una de las siguientes técnicas:

- a.1) Toma de muestras por medio de cortes. Si el queso tiene una base circular, con un cuchillo con hoja puntiaguda, hacer dos cortes radiales a partir del centro del queso, y si tiene una base rectangular, hacer dos cortes paralelos con los lados. El tamaño de la pieza obtenida debe ser de tal manera, que una vez eliminada la capa superior incomible, la porción comestible restante no sea inferior a 100g.
- a.2) Toma de muestras por medio de una sonda.
 - a.2.1) En una de las superficies planas, por lo menos a 10 cm del borde, insertar oblicuamente hacia el centro de una sonda estéril de 15 a 20 mm de diámetro, una o varias veces.
 - a.2.2) Insertar la sonda perpendicularmente por una de las superficies del queso hasta llegar, pasando por el centro, al lado opuesto.
 - a.2.3) Por la superficie vertical del queso, a igual distancia entre las dos superficies planas, insertar la sonda horizontalmente hasta el centro del queso.
 - a.2.4) De los quesos contenidos en barriles, cajas u otros recipientes de dimensiones grandes, o de los quesos que forman cubos grandes compactos, la muestra puede tomarse insertando la sonda oblicuamente, desde arriba hacia abajo, por el contenido del recipiente.
 - a.2.5) En el caso de quesos duros de grandes dimensiones, si el queso tiene envoltura interna, frotar con etanol al 70% (VV) el sitio de muestreo e insertar una sonda estéril de 15 a 20 mm de diámetro. Girar la sonda una vuelta completa y retirar el pedazo. Si no se necesita una muestra de la superficie, guardar la parte exterior (mínimo 2 cm) que contiene la envoltura interna para obtener el agujero(s) hecho en el queso y el resto del pedazo(s) con un escalpelo o un cuchillo estériles transferir asépticamente al frasco de muestra. Repetir este procedimiento hasta obtener una muestra no menor de 100 g. Con los tapones, obturar los agujeros con cuidado, y si es posible, cubrir con un compuesto sellante adecuado, ver NTE INEN 1529 1.
- b) Toma de muestras de canales vacunas y ovinas. Muestrear las canales con una de las siguientes técnicas:
 - b.1) Hisopos o torundas. Con guantes estériles colocar la plantilla (ver 5.3.1.5) sobre la superficie que se va a muestrear. Tomar asépticamente un hisopo, abrir un tubo que contenga el diluyente adecuado, humedecer el hisopo y con movimientos rotatorios presionarlo contra las paredes del tubo para retirar el exceso del diluyente. Friccionar fuertemente el área de la superficie que se va a examinar, haciendo frotos paralelos con una ligera rotación del hisopo. Friccionar nuevamente la superficie haciendo trazos paralelos perpendiculares a los anteriores, repetir tres veces este proceso humedeciendo cada vez el hisopo. Cuidar que se frote toda el área elegida. Regresar el hisopo al tubo y con una tijera estéril o cualquier otro implemento cortar o quebrar el palillo y dejar caer la cabeza dentro del tubo, tapar el tubo con la tapa de rosca y colocarlo en un envase a prueba de agua, acondicionar el envase con hielo picado o cualquier otro refrigerante disponible. Si el bastón no es de madera, agitar el hisopo n el tubo 10 veces hacia arriba y abajo. Identificar la muestra. Para realizar recuentos, utilizar la cantidad necesaria del diluyente para obtener una dilución inicial de 10^{-1}
 - b.2) Tomas de muestras por disección. Con un escalpelo y pinza estériles tomar lonchas superficiales muy delgadas de aproximadamente 2 mm de espesor de la herida del sacrificio, región pectoral, costado, regiones sacro, anal, renal y cuello. De las canales de cerdo, tomar a partir del cuello y del área situada detrás de las orejas. Colocar las lonchas en el frasco para muestras. Tomar una muestra no menor de 100 g.

(Continua)

- Toma de muestras con portaobjetos. Este método se utiliza especialmente para recuentos directos. Presionar un portaobjeto estéril contra la muestra del alimento, identificar y dejar que se seque. Enviar al laboratorio donde se fija, tiñe y se observa al microscopio. Para determinaciones cualitativas rápidas de la microflora dominante proceder de la siguiente manera: después de presionado el porta contra la superficie de la carne aplicar el porta a la superficie de agar de una placa y retirarlo con una pinza estéril y luego incubar la placa

5.5.2 Envío de las muestras al laboratorio

5.5.2.1 Enviar las muestras al laboratorio lo más rápido posible y en condiciones que reduzcan al mínimo la posibilidad de cambio de su calidad microbiológica y evitar que durante el transporte las muestras sean expuestas a la luz solar directa.

5.5.2.2 Manipular y empacar las muestras de modo que una manipulación posterior no pueda cambiar su identidad ni sugerir ninguna duda acerca de su identidad.

5.5.2.3 Siempre que sea posible, se deben enviar las muestras al laboratorio en su envase original, sin abrir. Todas las muestras envasadas, para su envío deben empacarse con materiales que puedan absorber los golpes para evitar que sufran daños durante el transporte.

5.5.2.4 Los productos de vida comercial prolongada, no necesitan de precauciones especiales excepto, por ejemplo: evitar temperaturas por encima de 45°C para los productos enlatados (latas en su estado normal) y ambientes húmedos para los productos en polvo.

5.5.2.5 Las latas hinchadas se deben refrigerar y enviarlas acondicionadas con mucho papel y material amortiguador y material refrigerante.

5.5.2.6 Los productos perecederos no congelados se enfrían hasta 0 a 5°C, sea en un refrigerador o más rápidamente en un baño de hielo) en fundas plásticas) y se los envía en recipientes isotérmicos, cubiertos con una bandeja que contenga suficientes fundas plásticas con hielo picado o una mezcla de polialcoholes congelados, para mantener la temperatura de 0 a 5°C hasta su llegada al laboratorio. No utilizar hielo suelto ya que si el envase se revienta o tiene fugas puede contaminar el producto. Si se utiliza hielo seco, acondicionar la muestra de manera que no entre en contacto con el hielo para evitar su congelamiento.

5.5.2.7 Productos congelados, las muestras de estos productos se deben recoger en recipientes pre enfriados y colocarlos inmediatamente en un congelador, o en el hielo seco. Enviar al laboratorio en un recipiente isotérmico, o en caja de cartón, con nieve carbónica (dióxido de carbono sólido). Evitar que las muestras congeladas, tomadas en fundas plásticas entren en contacto directo con el hielo seco porque el plástico se torna friable y puede romperse. Utilizar papel u otro material adecuado para proteger la muestra. Como control que la muestra no se ha descongelado durante el transporte, colocar dentro del paquete un recipiente con trocitos de hielo que deben estar intactos a la llegada del paquete con las muestras.

5.5.2.8 Indicar claramente sobre el paquete si la muestra es perecible o no, la temperatura a que se debe mantenerse, refrigerada en hielo seco, si es frágil, etc.

5.5.2.9 Enviar las muestras juntamente con el informe de la toma

5.5.3 Procedimiento para preparación de la muestra para el análisis

5.5.3.1 Líquidos

a) Si el espacio de cabeza es lo suficientemente grande, se debe mezclar el producto agitando el envase 25 veces en 10 segundos haciendo un arco de 300mm. Se puede utilizar un homogeneizador estandarizado para asegurar una distribución uniforme de los microorganismos.

b) Si es espacio de cabeza es pequeño, mezclar el producto invirtiendo el envase de 25 veces, luego:

b.1) Retirar una porción de líquido hasta que haya suficiente espacio de cabeza y entonces mezclar mediante agitación (ver 5.5.3.1 literal a); o

b.2) Transferir la muestra completa, o un parte de ella, a un envase estéril de tamaño adecuado y agitando mezclar bien (ver 5.5.3.1 literal a). En el caso de muestras líquidas con gas, incorporar unas perlas de vidrio estériles y agitar.

5.5.3.2 Polvos. Seguir los procedimientos indicados en 5.5.3.1 literal a y 5.5.3.1 literal b utilizando una espátula estéril.

5.5.3.3 Productos congelados. Si las muestras están congeladas, utilizar una de los siguientes procedimientos:

- a) Descongelarlas parcialmente en su recipiente original cerrado (o en el que llegó al laboratorio), por no más de 24h en un refrigerador entre 2°C y 5°C. Cuando se necesita más de 24h para descongelar las muestras, se pueden colocar en un baño de agua a una temperatura menor de 37°C y se les mantiene sólo hasta que se fundan (máximo hasta 15 minutos, pero, la temperatura debe permanecer baja para evitar lesionar a los microorganismos) o, a temperatura ambiente por no más de 1 hora.
- b) Si la muestra congelada puede picarse fácilmente, el descongelamiento no es necesario.
- c) Con productos fácilmente descongelables (productos obtenidos con taladro, por ejemplo: jugos congelados, huevos congelados, etc.), se les descongela en un baño de agua a temperatura ambiente, según indica en 5.5.3.1 literal a
- d) Los helados se funden según se indica en el numeral 5.5.3.1 literal a (si se encuentran en su envase original primero se los transfiere a un frasco estéril con tapa): Mezclar bien la mezcla fundida.

5.5.3.4 Mantequilla, margarinas y mantecas.

- a) Colocar la muestra de mantequilla en el refrigerador (4°C ± 1°C), hasta que se torne dura y se pueda cortar.
- b) Con utensilios estériles, dividir la muestra de mantequilla, margarina o manteca en tres partes y del centro de cada una de estas superficies (no contaminadas) que quedan expuestas, pesar la unidad analítica en un frasco y añadir el diluyente (ver 5.3.2.11) a 32°C, en un volumen necesario para completar, juntamente con la fase acuosa, dos veces la unidad analítica, por ejemplo: las mantequillas y margarinas que tengan una humedad de 16%, pesar 25 g de muestra y añadir 46 cm³ de diluyente; si se pesan 50 g, añadir 92 m³.
- c) En el caso de las mantecas añadir un volumen igual a dos veces la muestra: 25 g de muestra y 50 cm³ diluyente.
- d) Colocar el frasco en un baño de agua a no más de 45°C y, evitando un calentamiento excesivo, agitar hasta que la muestra y el diluyente se mezclan completamente.
- e) Conservar el frasco en el baño de agua hasta que la materia grasa se separe de la fase líquida. Utilizar esta fase líquida para las determinaciones microbiológicas: 2 cm³ de este líquido corresponden a 1 g de muestra y 0,2 cm³ a 0,1 g. Continuar el ensayo según lo indicado en 5.4.4.2.literal (a.2).

5.5.3.5 Mayonesa. Preparar la muestra según lo indicado en 5.4.3.4

5.5.3.6 Carnes y otros productos. Usando por su naturaleza, el producto en análisis puede causar dificultades sino se homogeniza directamente, entonces antes de manipular, asépticamente proceder según 5.5.3.6.literal (a) y/o 5.5.3.6 literal (b).

- a) Picado. Colocar el material en una superficie estéril, cortar en cubos de 1 cm³ y continuar según lo indicado en 5.5.3.6 literal (b).
- b) Trituración. Colocar el material (picado o no) en un frasco estéril, adicionar el exudado que hubiere, mezclar, homogenizar dos veces y continuar según lo indicado en 5.4.4.2 literal (b).

(Continúa)

5.5.3.7 Canales de aves y productos misceláneos. Anotar el peso de la muestra, colocar la canal en una funda plástica estéril y lavar con 300 cm³ de agua peptonada al 0,1% friccionando la superficie de la muestra durante 30 segundos. Aplicar este procedimiento a frutas secas, cereales, legumbres y ensaladas, lavando con una cantidad de diluyente 10 veces el peso de la muestra. Si es necesario continuar como se indica en 5.4.4.2 literal (a.3).

5.5.3.8 Hisopos o torundas. Al tubo que contiene el hisopo juntamente con el diluyente (ver 5.2.1.5 y 5.3.2.4), agitarlo vigorosamente, haciendo 50 ciclos completos de 15 cm en 10 segundos golpeando contra la palma de la otra mano, para desprender los microorganismos de la superficie del hisopo. La dispersión obtenida se puede diluir decimalmente. Si es necesario, continuar como indica en 5.4.4.2 literal (a.3).

5.5.3.9 Productos formados por capas. Si el alimento está formado por capas o extractos, examinar una porción de 10 g del paquete completo, o separadamente, preparar una suspensión inicial de cada una de estas partes, dependiendo del propósito del ensayo. Preparar como se indica en 5.4.4.2 literal (b).

5.5.4 *Procedimiento para preparación de la suspensión inicial o dilución primaria y otras diluciones*

5.5.4.1 Generalidades

- a) El tamaño de la unidad muestra generalmente 10 g ó 10 cm³ o un múltiplo de 10 y, debe ser tal, que permita realizar todos los ensayos requeridos.
- b) Para la detección de Salmonella, en general, preparar la suspensión inicial con una unidad de muestra de 25 g (cm³) y 225 cm³ del diluyente indicado en la NTE INEN 1529-15. Si la unidad de muestra prescrita difiere de 25 g, utilizar la cantidad necesaria de diluyente para obtener una dilución de aproximadamente 1/10 (masa/volumen) (ver nota 5).
- c) Mezclar la unidad de muestra o porción de ensayo con un volumen de diluyente igual a nueve veces el peso de la unidad analítica. Si se obtiene una suspensión inicial demasiado viscosa o espesa adicionar más diluyente. Esto se debe tener en cuenta para las operaciones subsiguientes y/o expresión de resultados.
- d) Para evitar lesionar a los microorganismos por cambios súbitos de la temperatura; la temperatura de los diluyentes debe ser aproximadamente la misma de la muestra, a menos que haya otra indicación.
- e) La preparación de la suspensión inicial de algunos tipos de productos necesitan de cuidados especiales, tales como:
 - e.1) Alentar a temperaturas inferiores a 45°C por no más de 15 minutos productos como cacao en polvo, gelatina, productos en polvo, mantecas, mantequillas. Para los quesos utilizar el diluyente a 44°C ± 1°C.
 - e.2) Neutralizar los alimentos ácidos con una solución estéril de fosfato tripotásico al 8%, antes de preparar la suspensión inicial.
 - e.3) Reconstituir los productos deshidratados y revitalizar a los microorganismos lesionados por los procesos de elaboración y almacenamiento de los productos alimenticios.
 - e.4) Para productos grasosos o pulverulentos que forman grumos, adicionar al diluyente un agente humectante como el "tergitol Aniónico 7" (1% m/v).
 - e.5) Cuando se va a realizar recuentos de esporas, a la suspensión inicial, inmediatamente después de preparada, someterla a un tratamiento térmico (por ejemplo, 80°C por 10 minutos) seguido de un enfriamiento rápido en un baño de agua helada.

NOTA 5 Con el objetivo de reducir la sobrecarga de trabajo en el laboratorio, y cuando hay evidencia de que la mezcla de dos o más unidades de muestra no afecta el resultado para aquel alimento particular, existe la alternativa de preparar unidades de muestra compuesta. El tamaño máximo de una unidad de muestra compuesta es de 375 g (15 unidades de muestra de 25 g). por ejemplo, si es necesario analizar 10 unidades de muestra de 25 g, se mezclan las 10 unidades de muestra compuesta de 250 g y se adicionan 2,25 litros del diluyente, ver NTE INEN 1529-15. Alternativamente, se puede preparar una muestra compuesta transferido a alícuotas de 0,1 cm³ de cada uno de los 10 cultivos de pre-enriquecimiento a un frasco que contenga 100 cm³ de caldo RV, o alícuotas de 0,1 cm³ de cada uno de 10 cultivos de pre-enriquecimiento a un frasco que contenga 100 cm³ de caldo RV, o alícuotas de 10 cm³ a un frasco que contenga 1 litro de caldo selenito cistina o caldo tetrationato.

5.5.4.2 Suspensión inicial o dilución primaria (10^{-1})

- a) Líquidos: Productos líquidos no viscosos (agua, leche, jugos, enjuagues, etc.) en los cuales los microorganismos se distribuyen homogéneamente o que fácilmente se los puede homogenizar por medios mecánicos; fase líquida de mezclas heterogéneas que se considera que es lo suficientemente representativa de la muestra en conjunto (fase líquida de las grasas vegetales o animales) y productos líquidos viscosos.
- a.1) Líquidos no viscosos, con una pipeta estéril transferir 10 cm^3 a un frasco y añadir 90 cm^3 de diluyente. Mezclar cuidadosamente esta solución agitando el frasco 25 veces en 10 segundos haciendo un arco de 300 mm, o aspirando 10 veces con una pipeta estéril, o utilizando un homogeneizador tipo "Vortex" por 5 a 10 segundos. Seleccionar la velocidad de tal manera para que el líquido, suba en torbellino hasta 2 o 3 cm del borde del vaso. Si se requieren otras diluciones, continuar según lo indicado en literal 9.3.
- a.2) De las mantequillas y mantecas, de la fase líquida (ver 5.4.3.4.literal e) tomar 2 cm^3 y añadir 8 cm^3 de diluyente, se obtiene la dilución 10^{-1} . Para las otras diluciones, continuar con lo indicado en 9.3.
- a.3) Enjuagues, la solución de enjuague obtenida en los numerales 5.4.3.7 y 5.4.3.8 constituye la dilución primaria, siempre que, para el enjuague se utilice el volumen adecuado de diluyente (ver 5.3.2.7 literal b1). Para otras diluciones, continuar como se indica en 5.4.4.3.
- a.4) De los líquidos viscosos y helados fundidos (ver 5.4.3.3 literal d) pesar 10 g de muestra en 90 cm^3 de diluyente y mezclar bien mediante agitación (para pesar, se puede utilizar una cuchara o una pipeta, dependiendo de la consistencia de la muestra). Para otras diluciones continuar según lo indicado en 9.3.
- b) Productos sólidos. (ver notas 6)
- b.1) Pesar con una precisión de 0,1 g en un frasco (si se utiliza homogeneizador rotatorio), o en una funda plástica (si se utiliza "stomacher"), 10 g (o un múltiplo de 10 g) de la muestra de población o de la submuestra preparada. Añadir 90 cm^3 de diluyente (o múltiplo de 10 g) de la muestra de población o de la submuestra preparada. Añadir 90 cm^3 de diluyente (o múltiplo de 90) a la temperatura adecuada (dilución 10^{-1}).
- b.2) Hacer funcionar el homogeneizador a baja velocidad y en pocos segundos pesar a la velocidad entre 15000 a 20000 rpm. Cridar escrupulosamente que el tiempo de homogenización a alta velocidad no exceda de dos minutos. Para productos blandos o que forman mucha espuma es suficiente un minuto.
- b.3) Hacer funcionar el "stomacher" 1 ó 2 minutos, según la naturaleza del producto (ver nota 6.2).
- b.4) Si es necesario, dejar en reposo hasta 15 minutos para que las partículas grandes se sedimenten. Para preparar otras diluciones utilizar la capa superficial y si hay una capa de grasa, tomar de la parte acuosa.

NOTAS 6

6.1 Con algunos productos no es aconsejable utilizar el stomacher (por ejemplo, los que tienen elementos puntiagudos o cortantes, o aquellos que no se disgregan fácilmente), pudiéndose utilizar siempre que haya evidencia (datos publicados o ensayos comparativos) que los resultados obtenidos no difieren significativamente de los obtenidos con un homogeneizador rotatorio.

6.2 Prestar atención al hecho que para determinados productos, en especial cereales, los tiempos 1 y 2 minutos no son adecuados para microorganismos tales como los mohos y levaduras. En este caso el stomacher permite una mejor recuperación que el homogeneizador rotatorio. Hacer funcionar el stomacher por 10 minutos evitando separaciones, ya que se pueden perder algunos mohos y levaduras del líquido sobrenadante.

5.5.4.3 Otras diluciones (ver nota 7)

- a) Si la dilución primaria se homogeneizó con pipeta, utilizar la misma pipeta para transferir 1 cm^3 de la suspensión inicial (dilución 10^{-1}) a otro tubo que contenga 9 cm^3 de diluyente estéril a la temperatura adecuada, evitar que la pipeta entre en contacto con el diluyente y con la otra pipeta estéril mezclar cuidadosamente. De esta manera se obtiene la dilución 10^{-2} .
- b) Si es necesario, repetir lo indicado en el numeral 9.3.1 para la dilución 10^{-3} y siguientes diluciones, hasta obtener el número necesario de diluciones y alcanzar el número adecuado de microorganismos por cm^3 . Cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración.

5.5.4.4 Duración del procedimiento. El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y la mezcla de las diluciones con el medio de cultivo (descrito en el método específico de ensayo) no debe ser mayor que 45 minutos. El tiempo transcurrido entre la preparación de la suspensión inicial y el inicio de la preparación de las siguientes diluciones no debe exceder los 30 minutos.

5.5.4.5 Revitalización

- a) Los microorganismos presentes en los alimentos pueden estar lesionados o debilitados debido a los tratamientos que se utilizan en el procesamiento de alimentos. Entre los tratamientos que lesionan a los microorganismos tenemos el calor, frío, desecación, liofilización, congelación, baja actividad de agua e irradiación. Los tratamientos químicos adversos como carencia de nutrientes, pH bajo, preservantes y exposición a desinfectantes.
- b) El número de microorganismos que son detectados en los diferentes medios depende de la severidad y duración de las condiciones adversas, tipo de microorganismo presentes y la composición del medio utilizado, especialmente si es selectivo.
- c) Cuando es necesario, los procedimientos de revitalización están incluidos en las secciones pertinentes de las NTE INEN 1529.

NOTA 7 Para la prueba de presencia o ausencia de microorganismos en $0,1 \text{ cm}^3$ ó $0,1 \text{ g}$ de producto, no se necesita preparar las siguientes diluciones.

(Continúa)

APÉNDICE Z

Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-5	<i>Control Microbiológicos de los Alimentos. Determinación del número de microorganismos aeróbios mesófilos REP.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-6	<i>Control Microbiológicos de los Alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del Número más Probable.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-7	<i>Control Microbiológicos de los Alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica de recuento de colonias.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-8	<i>Control Microbiológicos de los Alimentos. Determinación de coliformes fecales y Escherichia coli.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-9	<i>Control Microbiológicos de los Alimentos. Determinación de la presencia o ausencia de coliformes (utilizando medio líquido).</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-10	<i>Control Microbiológicos de los Alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuento en placa por siembra en profundidad.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-11	<i>Control Microbiológicos de los Alimentos. Mohos y levaduras viables. Detección.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-13	<i>Control Microbiológicos de los Alimentos. Enterobacteriaceae. Recuento en placa por siembra en profundidad.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-14	<i>Control Microbiológicos de los Alimentos. Staphylococcus aureus. Recuento en placa de siembra por extensión en superficie.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-15	<i>Control Microbiológicos de los Alimentos. Salmonella. Método de detección.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-16	<i>Control Microbiológicos de los Alimentos. Shigella. Método de detección.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-17	<i>Control Microbiológicos de los Alimentos. Bacterias anaerobias mesófilas. Recuento en tubo por siembra en masa.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-18	<i>Control Microbiológicos de los Alimentos. Clostridium perfringens. Recuento en tubo por siembra en masa.</i>
Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-19	<i>Control Microbiológicos de los Alimentos. Recuento en placa por siembra en profundidad.</i>

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Norma internacional. ISO/FDIS 6887-6:2010. *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage.*, Ginebra, 2010.

Norma Chilena. NCh3057:2007. *Microbiología de los alimentos de consumo humano y animal - Métodos horizontales para técnicas de muestreo desde superficies usando placas de contacto y mórulas.* Santiago, 2007.

Norma Internacional ISO 6887-1:1999. *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.* Ginebra, 1999.

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Documento: NTE INEN 1529-2 **TÍTULO:** CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. TOMA, ENVÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO **Código:** AL 01.05-318
Primera revisión

ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio:	REVISIÓN: Fecha de aprobación anterior por Consejo Directivo 1998-11-12 Oficialización con el Carácter de Voluntaria por Acuerdo No. 990025 de 1999-02-03 publicado en el Registro Oficial No. 133 de 1999-02-22 Fecha de iniciación del estudio: 2012-07-30
--	--

Fechas de consulta pública: 2012-12-03 a 2013-01-02

Subcomité Técnico de:

Fecha de iniciación:

Integrantes del Subcomité:

Fecha de aprobación:

NOMBRES:**INSTITUCIÓN REPRESENTADA:**

Mediante compromiso presidencial N° 16364, el Instituto Ecuatoriano de Normalización – INEN, en vista de la necesidad urgente, resuelve actualizar el acervo normativo en base al estado del arte y con el objetivo de atender a los sectores priorizados así como a todos los sectores productivos del país.

Para la revisión de esta Norma Técnica se ha considerado el nivel jerárquico de la normalización, habiendo el INEN realizado un análisis que ha determinado su conveniente aplicación en el país.

La Norma en referencia ha sido sometida a consulta pública por un período de 30 días y por ser considerada EMERGENTE no ha ingresado a Subcomité Técnico.

Otros trámites: Esta NTE INEN 1529-2:2013 (Primera revisión), reemplaza a la NTE INEN 1529-2:1999

La Subsecretaría de la Calidad del Ministerio de Industrias y Productividad aprobó este proyecto de norma

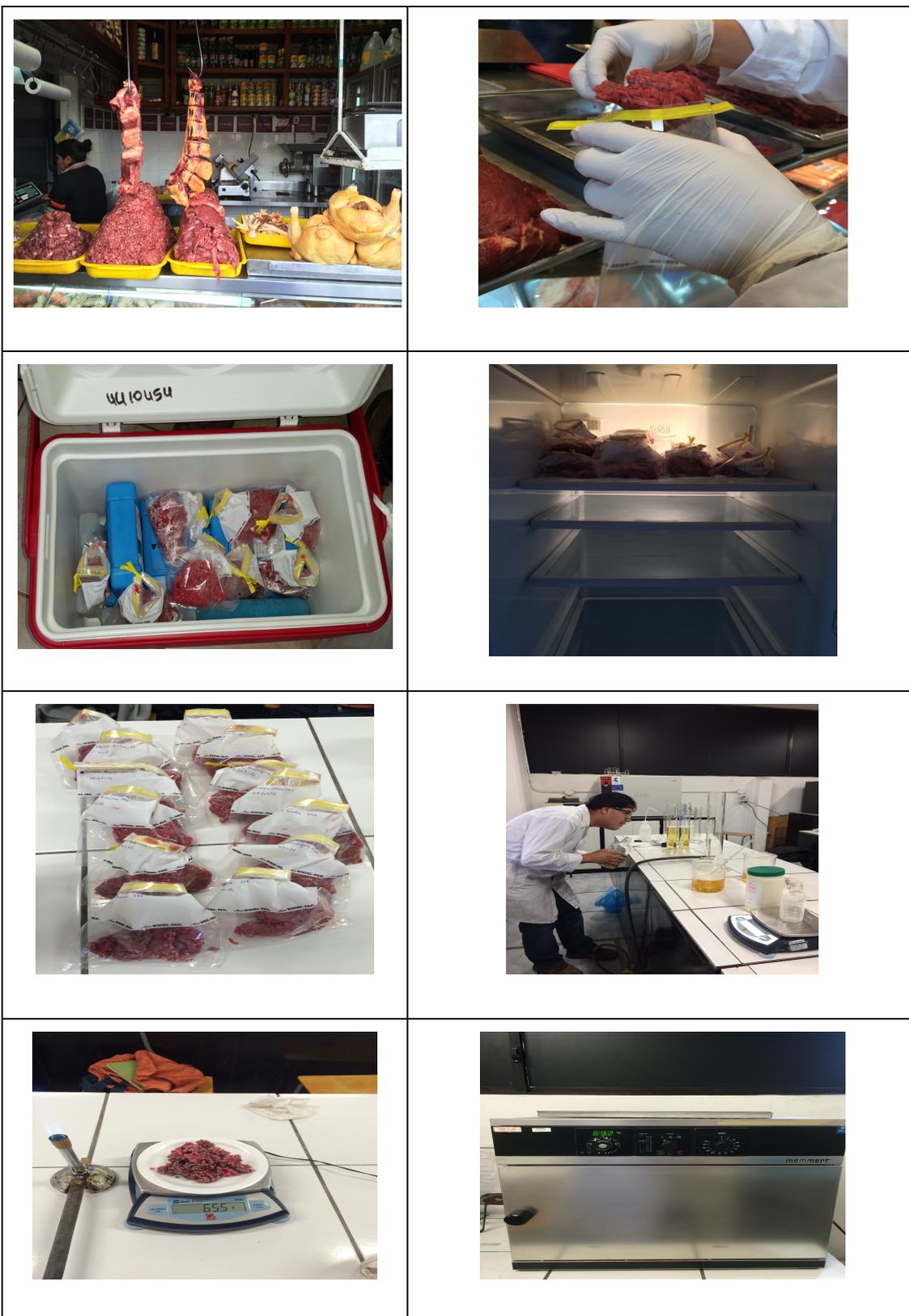
Oficializada como: Voluntaria
Registro Oficial No. 83 de 2013-08-18

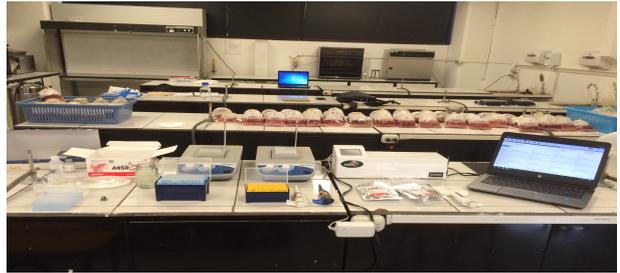
Por Resolución No. 13285 de 2013-08-13

**Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891 - Fax: (593 2) 2 567815
Dirección General: E-Mail: direccion@inen.gob.ec
Área Técnica de Normalización: E-Mail: normalizacion@inen.gob.ec
Área Técnica de Certificación: E-Mail: certificacion@inen.gob.ec
Área Técnica de Verificación: E-Mail: verificacion@inen.gob.ec
Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: inenlaboratorios@inen.gob.ec
Regional Guayas: E-Mail: inenguayas@inen.gob.ec
Regional Azuay: E-Mail: inencuenca@inen.gob.ec
Regional Chimborazo: E-Mail: inenriobamba@inen.gob.ec
URL: www.inen.gob.ec**

Anexo 4. Recolección y procesamiento de muestras.

GRAFICOS.





Anexo 5. Lotes del kit ANSR®, empleados para los análisis.



ANSR for *E. Coli* O157:H7
Product No. 9822

Lot No.: 226545
Exp. Date: Jul 21, 2016

A representative sample of this lot was tested according to Neogen Standard Assay Procedures. Testing was performed in compliance with the product information sheet. This product met or exceeded established performance specifications as listed below.

Performance

SENSITIVITY	SPECIFICATION	RESULT	DECISION
<i>E. coli</i> O157:H7 Strain 1	10 ⁴ cfu/mL	All Replicates Positive	Pass
<i>E. coli</i> O157:H7 Strain 2	10 ⁴ cfu/mL	All Replicates Positive	Pass
<i>E. coli</i> O157:H7 Strain 1	10 ³ cfu/mL	All Replicates Positive	Pass
<i>E. coli</i> O157:H7 Strain 2	10 ³ cfu/mL	At Least Half of Replicates Positive	Pass

SPECIFICITY	SPECIFICATION	RESULT	DECISION
<i>E. coli</i> O157:H38	>10 ⁵ cfu/mL	All Replicates Negative	Pass
<i>E. coli</i> O145:H28	>10 ⁵ cfu/mL	All Replicates Negative	Pass
<i>E. coli</i> O141:H26	>10 ⁵ cfu/mL	All Replicates Negative	Pass
<i>E. coli</i> O103:H2	>10 ⁵ cfu/mL	All Replicates Negative	Pass
<i>E. coli</i> O26:H32	>10 ⁵ cfu/mL	All Replicates Negative	Pass
<i>E. coli</i> O26:H11	>10 ⁵ cfu/mL	All Replicates Negative	Pass

The Lysis and Lysis Buffer supplied with this lot are universal components and have lot numbers and expiry dates different than what is defined on the Certificate of Analysis. The data above was generated using all components within the product lot.

Variances in data may occur. External factors such as stress from shipping, storage conditions, handling or contamination of components may influence results. Neogen Corporation certifies that this lot has met all internal quality control specifications for this product.

Caution: All kit assembly is a defined matrix and individual components should not be mixed with other kits.

Date: February 10, 2016

CofA-9870
 Rev: 1
 Effective: 10/30/15

620 Leshar Place • Lansing, MI 48912 • 800/234-5333 (USA/Canada) • 517/372-9200
 foodsafety@neogen.com • www.neogen.com

Page 1 of 1



ANSR for E.coli Media
Product No. 9815

Lot No.: 218468
Exp Date: Jun 30, 2019

Performance

TEST ITEM	SPECIFICATION	RESULTS	DECISION
Appearance:	Medium should be light beige to yellow brown in color and free-flowing without clumping	Light beige to yellow brown, free-flowing	Pass
Solubility:	8.9 grams dissolves in 225 mL of water in less than 5 minutes	Solubilizes within 5 minutes	Pass
Fill Weight:	>500 grams per bottle	>500 grams per bottle	Pass
Sterility:	Material exposed to a minimum of 12 kGy of irradiation	≥ 12 kGy	Pass
pH:	pH of rehydrated medium should be 7.0 ± 0.2	7.0 ± 0.2	Pass
Performance:	All bags inoculated with <i>E.coli</i> O157:H7 should be positive using the REVEAL for <i>E.coli</i> O157:H7 device. (Strains used: ATCC 35150, ATCC 43888, ATCC 43889, ATCC 43895)	All bags REVEAL positive	Pass
	Bags inoculated with non <i>E.coli</i> O157:H7 should be negative using the REVEAL for <i>E.coli</i> O157:H7 device. (Strain used: ATCC 25922)	All bags REVEAL negative	Pass

Variances in performance may occur. External factors such as stress from shipping, storage conditions, handling or contamination of components may influence results. Neogen Corporation certifies that this product has met all internal quality control specifications.

Valencia Ralington
 Valencia Ralington
 Quality Control Manager

Date: Monday, July 20, 2015

CofA-9815
 Rev: 0
 Effective: 5/29/15

620 Leshar Place • Lansing, MI 48912 • 800/234-5333 (USA/Canada) • 517/372-9200
 foodsafety@neogen.com • www.neogen.com

Page 1 of 1

Anexo 6. Prueba para la determinación de E. coli O157:h7 por el método de ANSR®

Test Procedure

Please read kit insert instructions completely before performing test.



1. Add 50 µL of enriched sample to the cluster tube.



2. Add 450 µL of lysis reagent solution to the sample.



3. Transfer sample tubes to 37°C heat block and incubate for 10 minutes. Then transfer the lysis tubes to the 80°C heat block and incubate for 20 minutes.



4. Transfer 50 µL of the lysed sample to preheated lyophilized reagents (56°C) in the reader. Cap tubes and vortex briefly. Return tubes to reader. Close the lid and click START in the ANSR software to begin assay.



5. Results will be reported in 10 minutes and displayed as positive, negative or invalid.

Anexo 7. Certificado por la AOC Research Institute.



CERTIFICATION

AOAC® Performance TestedSM

Certificate No.
111502

The AOAC Research Institute hereby certifies that the performance of the test kit known as:

ANSR® for *E. coli* O157:H7

manufactured by
Neogen Corporation
620 Lesher Place
Lansing, MI 48912
USA

This method has been evaluated in the AOAC® Performance Tested MethodsSM Program, and found to perform as stated by the manufacturer contingent to the comments contained in the manuscript. This certificate means that an AOAC® Certification Mark License Agreement has been executed which authorizes the manufacturer to display the AOAC Performance TestedSM certification mark along with the statement - "THIS METHOD'S PERFORMANCE WAS REVIEWED BY AOAC RESEARCH INSTITUTE AND WAS FOUND TO PERFORM TO THE MANUFACTURER'S SPECIFICATIONS" - on the above mentioned method for a period of one calendar year from the date of this certificate (November 24, 2015 – December 31, 2016). Renewal may be granted at the end of one year under the rules stated in the licensing agreement.

Deborah McKenzie

Deborah McKenzie, Senior Director
Signature for AOAC Research Institute

November 24, 2015

Date

2275 Research Blvd., Ste. 300, Rockville, Maryland, USA Telephone: +1-301-924-7077 Fax: +1-301-924-7089
Internet e-mail: aoacri@aoac.org * World Wide Web Site: <http://www.aoac.org>

Anexo 8. Instructivo de Buenas Prácticas de Manufactura.



Este instructivo ha sido diseñado tomando como guía la Resolución ARCSA-DE 067-015-GGG. (Normativa Técnica Sanitaria Unificada para Alimentos Procesados, Plantas procesadoras de Alimentos, Establecimientos de Distribución, Comercialización, Transporte de Alimentos y Establecimientos de Alimentación Colectiva.), con el fin de lograr una buena conservación y manipulación durante el expendio del producto y la Resolución ARCSA-DE-057-2015-GGG (Normativa Técnica Sanitaria sobre Prácticas Correctas de Higiene para Establecimientos Procesadores de Alimentos Categorizados como Artesanales y Organizaciones del Sistema de Economía Popular y Solidaria), Manual de Capacitación para Manipuladores de Alimentos. (www.panalimentos.org).

Fecha de Elaboración : Julio 2016.

Cuenca- Ecuador



INDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1: TRANSPORTE DE MATERIA PRIMA.....	2
CAPÍTULO 2: INSTALACIONES.....	2
CAPÍTULO 3: SERVICIOS BÁSICOS.....	3
CAPÍTULO 4: BATERIAS SANITARIAS.....	4
CAPÍTULO 5: CONTROL DE TEMPERATURA.....	4
CAPÍTULO 6: EQUIPOS, UTENCILLOS Y SUPERFICIES EN CONTACTO.....	5
DIRECTO.....	5
CAPÍTULO 7: CONDICIONES HIGIENICAS: PERSONAL – SALUD.....	5-6
CAPÍTULO 8: CAPACITACIONES.....	7
CAPÍTULO 9: LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN.....	7-8
CAPÍTULO 10: ALMACENAMIENTO.....	8-9
CAPÍTULO 11: CONTAMINACIÓN CRUZADA.....	9
CAPÍTULO 12: CONTROL DE PLAGAS.....	10

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: LOGÍSTICA Y COMPRAS.....	2
FIGURA 2: AGENCIA DE COORDINACIÓN DISTRITAL DEL COMERCIO.....	2
FIGURA 3: DIEZ FRASES SOBRE EL AGUA.....	3
FIGURA 4: BASURA FOTOS DE ARCHIVO E IMÁGENES.....	3
FIGURA 5: BATERIAS SANITARIAS EN ESPACIOS PÚBLICOS.....	4
FIGURA 6: TERMÓMETROS IMÁGENES DE ARCHIVO, VECTORES.....	4
FIGURA 7: MOLINOS PARA CARNE- MERCADO LIBRE.....	5
FIGURA 8: LAVADO DE MANOS.....	5
FIGURA 9: MANUAL DE MANIPULACIÓN DE ALIMENTOS.....	6
FIGURA 10: NATURAEDUCA.COM.....	6
FIGURA 11: CURSOS DE MANIPULACIÓN DE ALIMENTOS.....	7
FIGURA 12: BPM EN FÁBRICAS DE ALIMENTOS – LIMPIEZA.....	7
FIGURA 13: MOLINOS PARA CARNE- MERCADO LIBRE.....	8
FIGURA 14: AGROINFO.COM.....	8
FIGURA 15: PREVENCIÓN ENFERMEDADES INFECTOCONTAGIOSAS.....	9
FIGURA 16: PROGRAMAS DE SALUD.....	10



1.- INTRODUCCIÓN

Una alimentación segura y adecuada es un derecho humano por lo que la protección alimentaria es clave para la calidad de vida de los habitantes, de allí la importancia de realizar los debidos controles para alcanzar procesos de calidad desde su origen hasta el consumidor final protegiendo la salud de la población y garantizando la respectiva higiene de los alimentos.

Es así que este instructivo permitirá a las personas involucradas en la manipulación de la carne tengan conocimiento y aplicación de uso cotidiano.

CAPÍTULO 1

TRANSPORTE.

El transporte debe ser el adecuado de tal forma que se garantice las condiciones higiénicas y sanitarias de la materia prima desde su origen hasta el establecimiento final.



FIGURA 1

- El transporte debe realizarse a la temperatura de enfriamiento y debe existir aire en circulación, la temperatura máxima es de 7°C.
- La carne no debe tocar paredes ni pisos.
- El material del transporte debe estar integramente recubierto con material resistente a la corrosión, liso e impermeable, debe contar con rieles separadas con 50 cm entre ellos, los ganchos y utensillos serán de acero inoxidable.
- No se podrán transportar simultaneamente carnes y menudencias o carnes con otros productos; si transporta patas, pieles deberán introducirse en fundas.

CAPÍTULO 2

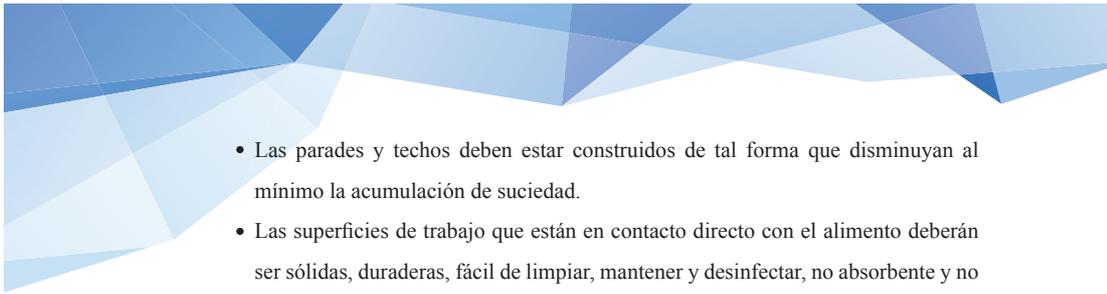
INSTALACIONES.

Las instalaciones deben estar diseñadas y construidas de tal manera que reduzcan al mínimo cualquier tipo de contaminación y que permitan un adecuado sistema de limpieza, desinfección y mantenimiento de los mismos.



FIGURA 2

- Los pisos deben ser de un material que no retenga agua, que no emitan sustancias tóxicas y que sean de fácil limpieza.
- Debe existir los respectivos drenajes para que permitan el flujo de el agua y no dar paso a la proliferación de bacterias.



- Las paredes y techos deben estar contruidos de tal forma que disminuyan al mínimo la acumulación de suciedad.
- Las superficies de trabajo que están en contacto directo con el alimento deberán ser sólidas, duraderas, fácil de limpiar, mantener y desinfectar, no absorbente y no tóxico.

CAPÍTULO 3

SERVICIOS BÁSICOS.

Estos servicios básicos como agua potable, luz, recolección de desechos son indispensable para los establecimientos que realizan actividades de manipulación de alimentos.



FIGURA 3

- El agua debe tener un sistema de drenaje que permita desembocar a la misma en el desagüe respectivo.
- Los cables de luz no deben estar colgados en ninguna de las áreas y deben estar cubiertos.
- El suministro del agua debe ser potable.
- Si existe iluminación artificial estas deben estar protegidas.



FIGURA 4

- Los basureros deben estar en áreas específicas e identificados fuera de las áreas de procesamiento, ser de un material lavable, con tapa, rotulados, con su respectiva funda plástica y con un pedal para poder abrirlos y deben ser evacuados frecuentemente durante el día.

CAPÍTULO 4

BATERIAS SANITARIAS.

Las baterías sanitarias no deben estar cerca o tener acceso directo a las áreas de manipulación de alimentos y estar provisto mínimo de :



FIGURA 5

- Lavamanos.
- Inodoro y urinario, cuando corresponda.
- Dispensador de jabón de pared provisto de jabón líquido.
- Dispensador de antiséptico, dentro o fuera de las instalaciones sanitarias.
- Dispensador provisto de papel higiénico.
- Las actividades de limpieza y desinfección de estas áreas deberán contar con un procedimiento establecido con sus respectivos registros.
- Basurero con funda plástica.
- Sistema de desagüe.

CAPÍTULO 5

CONTROL DE TEMPERATURA.

- Carnes de aves y conejos: 4°C o menor.
- Carne picada y preparados de carne picada: 2°C o menor.
- Los productos congelados se transportarán a temperaturas de -18°C o menor.
- Cada uno de los puntos de expendio debe disponer de medios de conservación del producto, por lo cual el control o monitoreo de temperatura es importante para garantizar la conservación de los mismos, se llevará un control de temperatura.
- Si se da procesos de descongelamiento se lo realizará a temperaturas congeladas y no a temperatura ambiente.

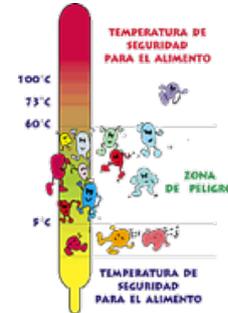


FIGURA 6

CAPÍTULO 6

EQUIPOS, UTENSILIOS Y SUPERFICIES : CONTACTO DIRECTO.

- Los equipos, maquinaria, utensilios así como las superficies que están en contacto directo con los alimentos deben ser no tóxicos, fáciles de limpiar y desinfectar.
- No deben usarse equipos o utensilios que se encuentren en mal estado ya que estos son una fuente de contaminación durante la manipulación del alimento.
- Las superficies que están en contacto directo deben ser lisas facilitando su limpieza, por ningún motivo deben ser porosas ya que esto permite la proliferación de microorganismos.
- Los utensilios que son usados para la manipulación del producto, deben ser almacenados de tal manera que no estén expuestos a posibles fuentes de contaminación como polvo, roedores u otros.
- La aplicación del desinfectante debe ser en dosis recomendadas por los fabricantes.
- Las tablas de picar deben ser de superficie lisa y mantenerse en buen estado de conservación e higiene; de preferencia diferenciadas para cada uso.
- Se puede utilizar utensilios de madera, siempre y cuando el material sea duro, no poroso y esté en buen estado de conservación e higiene.



FIGURA 7

CAPÍTULO 7

CONDICIONES HIGIENICAS DEL PERSONAL.

Lavado de Manos:

- Antes de iniciar la jornada de trabajo debe haber un correcto lavado de manos.
- Después de usar las baterías sanitarias.
- Luego de haber manipulados alimentos crudos como pollo, carne, pescado.



FIGURA 8

- Es importante lavarse las manos cuando hemos estado en contacto con dinero, basura, o productos químicos.
- Cuando se ha tocado la boca, rascado la cabeza, hurgado la nariz, es importante el lavado de manos de forma inmediata.

Vestimenta:

- La vestimenta del personal debe ser limpia, usar protectores de cabellos, guantes los mismos que deben ser desechables y cambiarse en cada actividad que se sospeche que pueda poner en riesgo al producto.
- Evitar el uso de joyas durante la manipulación de los alimentos.
- Mantener las uñas de las manos cortas, limpias, sin esmalte o barniz de uñas y el pelo largo recogido.
- No consumir alimentos, toser, fumar, escupir ya que son hábitos indeseables dentro de las áreas de manipulación.
- Mantener los puestos de trabajo limpios, desinfectados y en buenas condiciones.



FIGURA 9

Salud del personal:

- El personal que padece de enfermedades como resfriados, vómitos, diarreas, puede llegar a contaminar los alimentos por lo que debe ser retirado del área de manipulación de alimentos y acudir de inmediato a un chequeo médico.
- Si el personal presenta algún tipo de herida deber ser cubierta adecuadamente y es preferible ubicarlo en un área diferente hasta que sane su herida.
- El personal debe mantener controles médicos anuales a fin de prevenir enfermedades que pueden ser asintomáticas y que también son una fuente de contaminación en alimentos.
- El establecimiento deberá contar con un botiquín básico de primeros auxilios.



FIGURA 10

CAPÍTULO 8

CAPACITACIONES.

Mantener un buen sistema de capacitaciones para todo el personal que esta en contacto directo con los alimentos es primordial, estas capacitaciones deben contener temas como transporte, recepción, manipulación, conservación, limpieza , desinfección. Las capacitaciones deben ser periódicas y llevar su respectivo registro de asistencia.



FIGURA 11

CAPÍTULO 9

LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN.

La limpieza tiene como objetivo la eliminación de la suciedad orgánica y/o inorgánica adherida a las superficies. Desinfectar consiste en destruir la mayor parte de los microorganismos de las superficies mediante agentes químicos.



FIGURA 12

- Para la limpieza se emplearán detergentes en combinación con métodos físicos, para la desinfección se tomará en cuenta el tipo de microorganismos a eliminar .
- Todos los productos químicos y utensilios de limpieza estarán debidamente etiquetados y almacenados en un compartimiento seguro de uso exclusivo para este tipo de productos, y separado de las áreas de manipulación de alimentos
- El agua potable usada previamente en procesos de limpieza y desinfección no podrá ser reutilizada en procesos posteriores de limpieza o preparación de alimentos
- Se debe utilizar productos químicos de grado alimenticio pueden ser a base de amonio cuaternario, ácidos orgánicos.

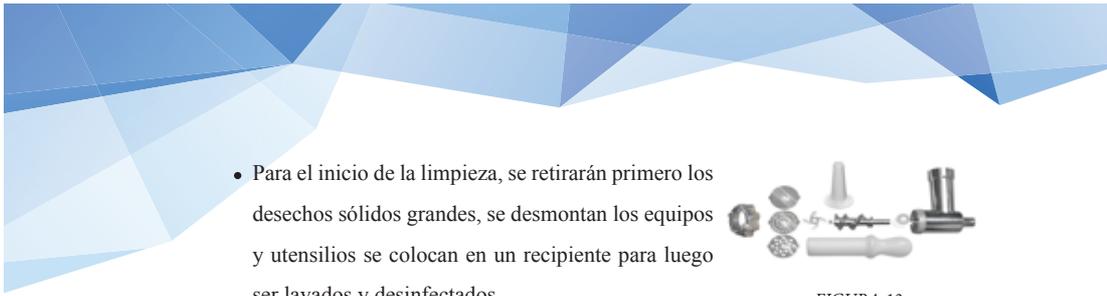


FIGURA 13

- Para el inicio de la limpieza, se retirarán primero los desechos sólidos grandes, se desmontan los equipos y utensilios se colocan en un recipiente para luego ser lavados y desinfectados.

- Para las superficies se humedece con agua, se esparce el detergente, se refriega, se deja actuar dependiendo de las instrucciones, se enjuaga y finalmente se aplica la solución desinfectante, el tiempo dependerá del producto, se deja escurrir o se enjuaga con agua abundante y se llevará un registro de limpieza diario.
- Los paños en uso para limpiar las superficies que están en contacto con los alimentos de origen animal crudos, se deben mantener separados de los paños que tienen otros usos.
- Los paños utilizados en limpieza y las soluciones químicas desinfectantes, no deben tener residuos de alimentos ni suciedad visible y deben ser ubicados en un lugar específico a fin de evitar la contaminación de alimentos, equipos y utensilios.
- Los paños en uso para limpiar las superficies de mesones y de otros equipos se deben mantener en una solución química desinfectante entre usos y ser lavadas diariamente.

CAPÍTULO 10

ALMACENAMIENTO.

- Debe existir áreas específicas, limpias y en buen estado para: materia prima, producto terminado, productos químicos, desechos y así evitar una contaminación cruzada.



FIGURA 14

- El lugar de almacenamiento debe mantener temperaturas óptimas de refrigeración para que no exista proliferación de bacterias.

- Almacenar los alimentos lejos de tuberías con pérdidas o condensación, al menos a 15 centímetros de distancia del suelo y con suficiente espacio entre los productos para permitir la circulación de aire.
- Proteger todo alimento con tapa o envoltorio (film plástico, aluminio).
- Durante el almacenamiento tener presente que lo que se ha procesado primero es lo primero que sale a la venta , (principio PEPS).
- En el lugar de almacenamiento debe evitarse la proliferación de plagas.

CAPÍTULO 11

CONTAMINACIÓN CRUZADA.

La contaminación cruzada se da de un alimento a otro es decir cuando existe alimentos contaminados que al manipularlos esos microorganismos son transferidos a los siguientes alimentos que vamos a manipular, o por una mala limpieza en los utensilios por lo que se aconseja lo siguiente:



FIGURA 15

- Separar los utensilios, equipos y demás accesorios para cada tipo de proceso y alimento así como mantener una buena limpieza de los mismos.
- Separar los alimentos crudos de los cocidos.
- Las superficies o áreas de trabajo deben ser limpiadas antes y después de cada trabajo o proceso realizado.
- Mantener un buen sistema de lavado de manos cuando se cambia de un alimentos a otro.
- En caso de roturas accidentales de material de vidrio o cerámica en áreas donde existan alimentos expuestos, éstos deberán ser desechados y el material para la limpieza será de uso exclusivo para este fin.
- En la manipulación de las carnes, se utilizarán tablas y cuchillos de uso exclusivo, de material resistente y lavable, equipos que estén en perfecto estado de mantenimiento, limpieza y desinfección.

- Se debe separar utensilios distintos de preparación de carnes crudas, como tablas, cuchillos, mesas y otros para evitar la contaminación cruzada.
- Se recomienda el uso de códigos de colores para diferenciar los utensilios.
- Las carnes frescas se deben manipular en un lugar separado de otros productos a temperatura ambiental controlada.

CAPÍTULO 12

CONTROL DE PLAGAS.

Un adecuado sistema de control de plagas permitirá mantener los alimentos libres de contaminantes transferidos por roedores, insectos, aves, fauna silvestre



FIGURA 16

- El establecimiento debe contar con un manejo integrado de plagas, el cual debe ser realizado por personal externo o interno capacitado; y se llevará sus respectivos registros y procedimientos. .
- Se podrán usar únicamente métodos y sustancias químicas para el control de plagas aptos para aplicar en establecimientos de alimentación de conformidad al uso para el que estén destinados, evitando la contaminación de los alimentos, superficies y utensilios.
- Los locales deben evitar tener basura o desechos reunidos que sean una fuente para atraer roedores o a su vez otro tipo de animales como por ejemplo los perros.
- Las instalaciones contarán con protecciones contra plagas las cuales deberán estar en buenas condiciones de funcionamiento.
- En caso de contar con elementos físicos como protectores anti insectos o trampas estos serán desmontables y de fácil limpieza.

Anexo 9. Figuras de los resultados obtenidos en las 78 muestras analizadas.

SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT

Test Detail

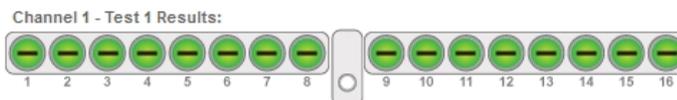
Test Type: 9822 O157:H7 Algorithm: 9822 20141031
 Set Temperatur 56.0°C Start Time: 09/07/2016 12:53:58PM
 Instrument ID: 1A54E315
 File Name: 6.json

Test Fields

User Name: FEDERICO TAPIA
 Lot ID: PRIMERO

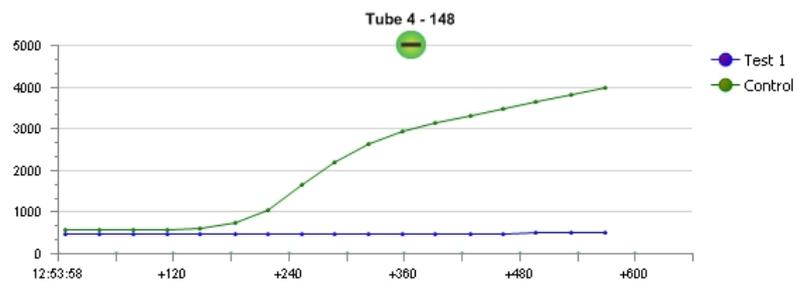
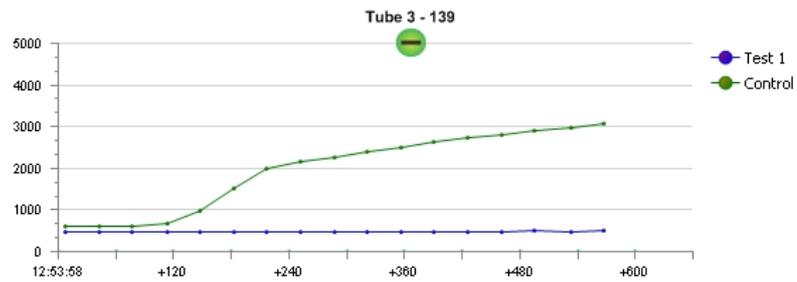
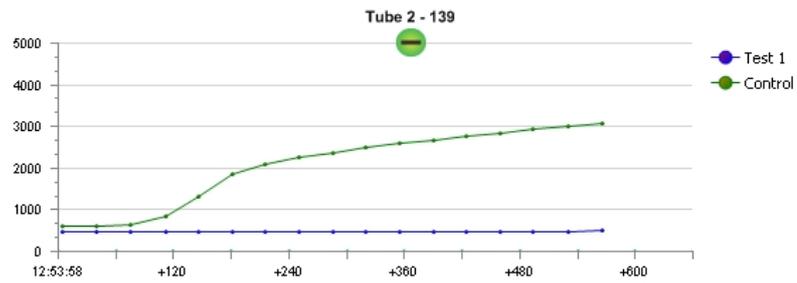
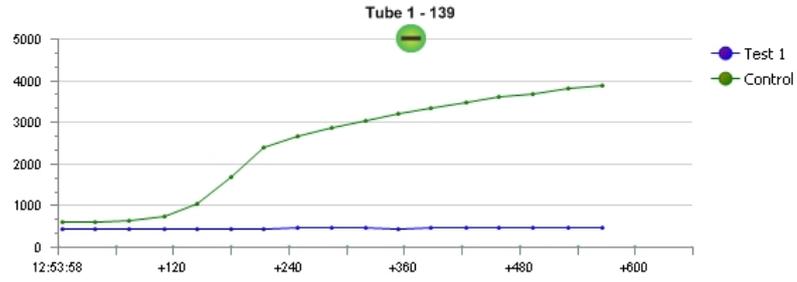
SAMPLE ID	CH1	SAMPLE ID	CH1
01. 139	Negative	09. 159	Negative
02. 139	Negative	10. 87	Negative
03. 139	Negative	11. 87	Negative
04. 148	Negative	12. 87	Negative
05. 148	Negative	13. 136	Negative
06. 148	Negative	14. 136	Negative
07. 159	Negative	15. 136	Negative
08. 159	Negative	16. 80	Negative

Test Results

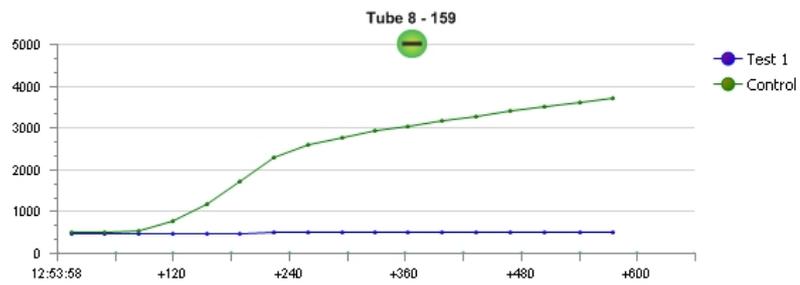
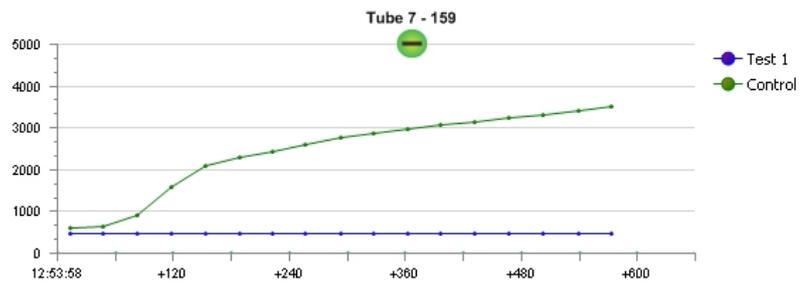
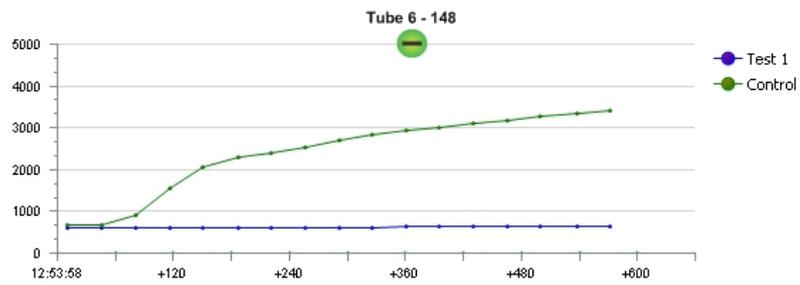
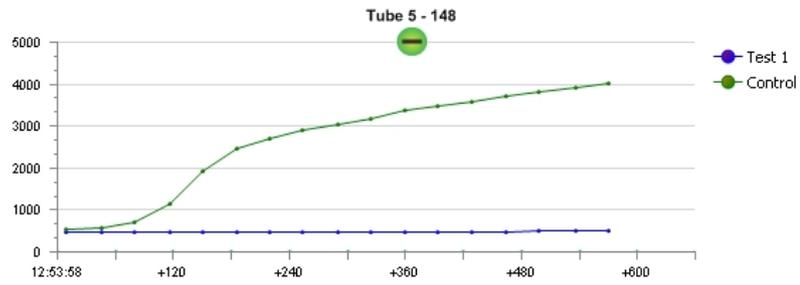


Comments

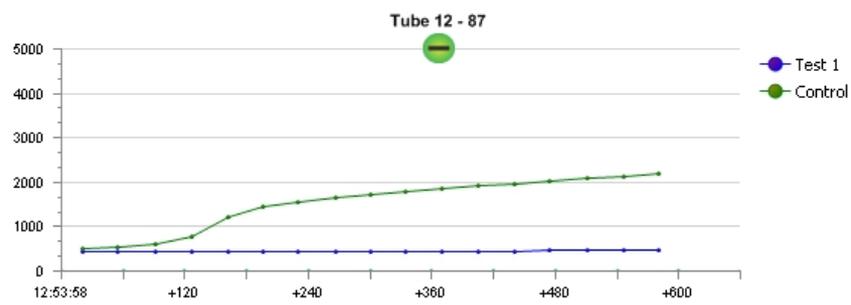
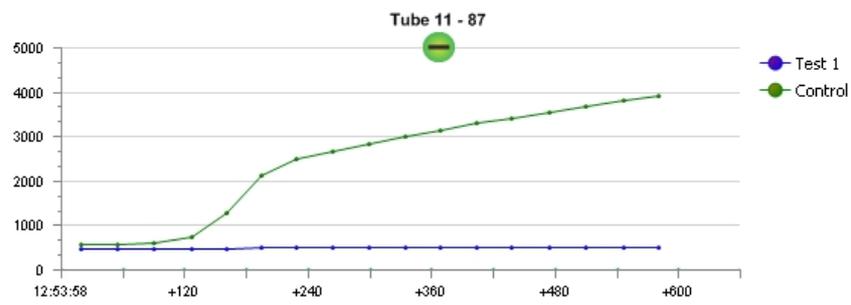
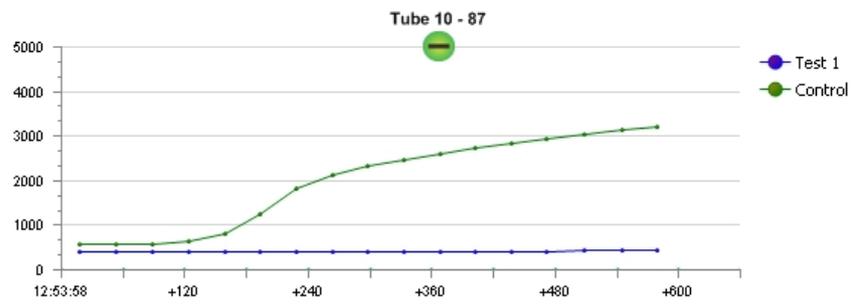
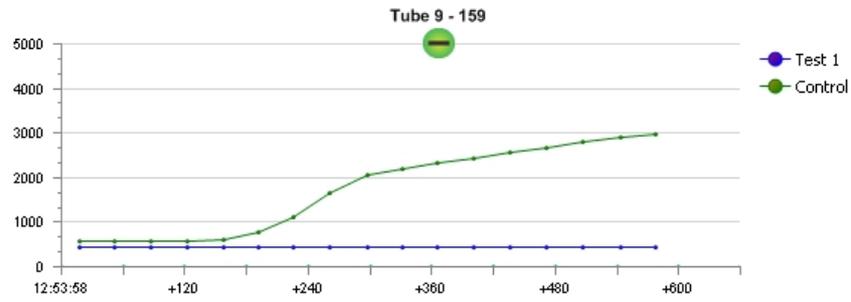
SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



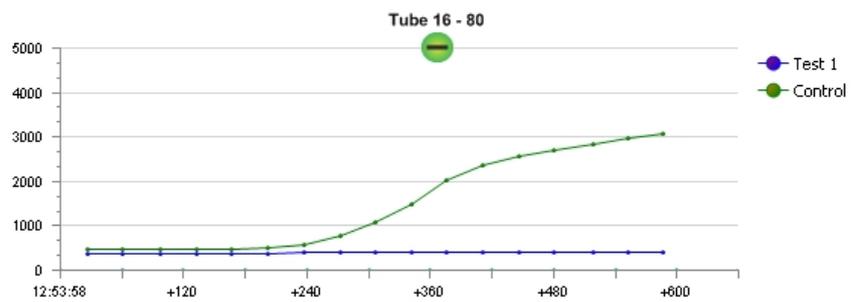
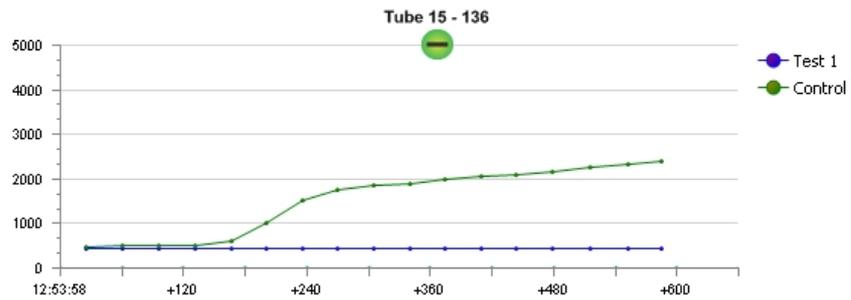
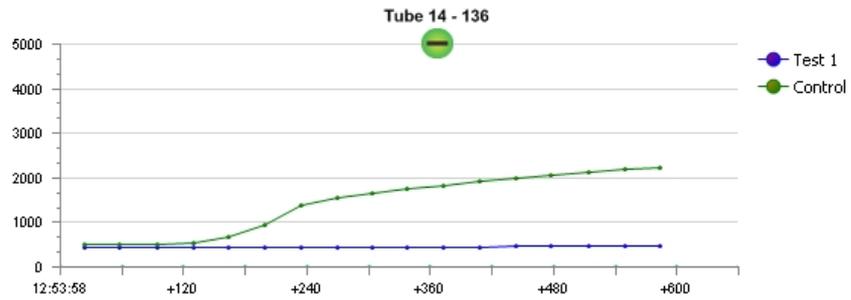
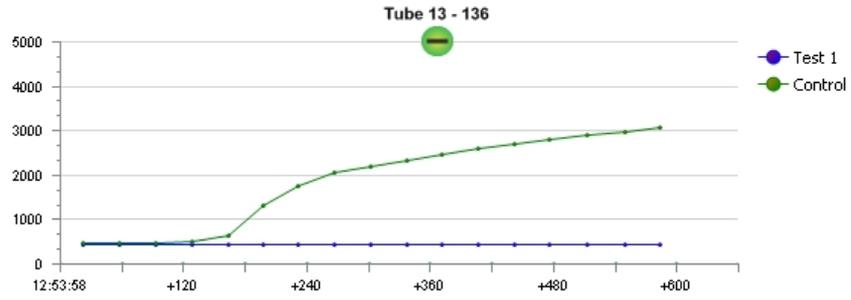
SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT

Test Detail

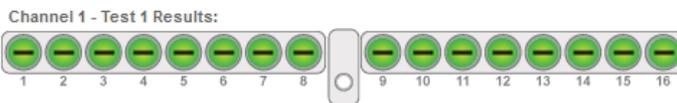
Test Type: 9822 O157:H7 Algorithm: 9822_20141031
 Set Temperatur 56.0°C Start Time: 09/07/2016 1:07:45PM
 Instrument ID: 1A54E315
 File Name: 7.json

Test Fields

User Name: FEDERICO TAPIA
 Lot ID: SEGUNDO

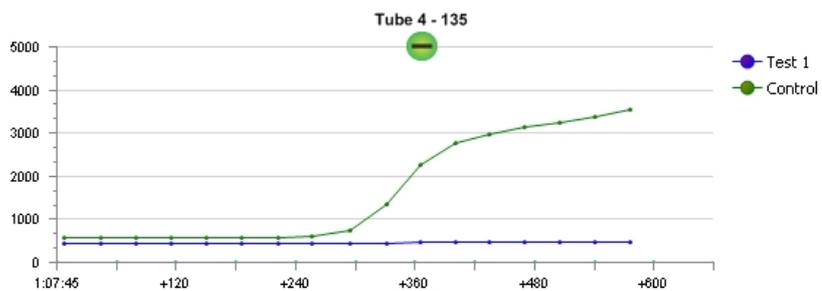
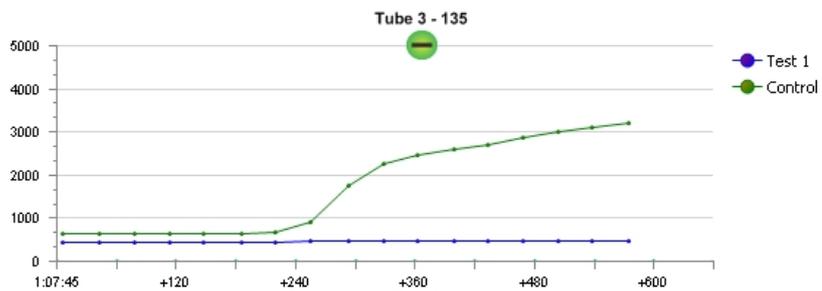
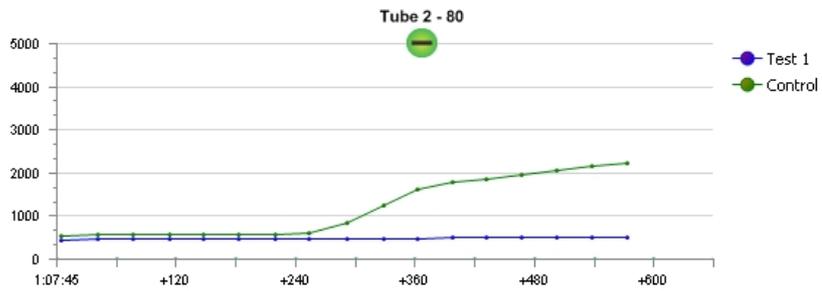
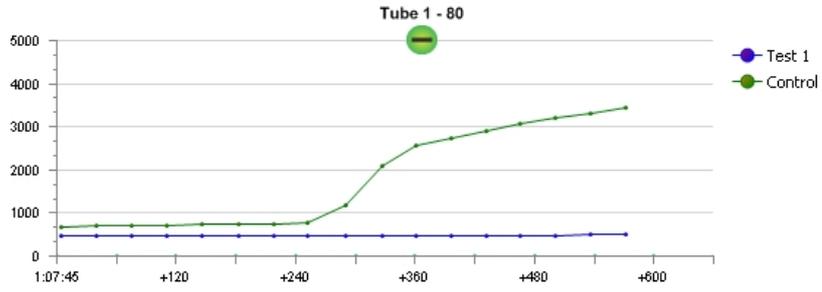
SAMPLE ID	CH1	SAMPLE ID	CH1
01. 80	Negative	09. 142	Negative
02. 80	Negative	10. 142	Negative
03. 135	Negative	11. 142	Negative
04. 135	Negative	12. 95	Negative
05. 135	Negative	13. 95	Negative
06. 84	Negative	14. 95	Negative
07. 84	Negative	15. 116	Negative
08. 84	Negative	16. 116	Negative

Test Results

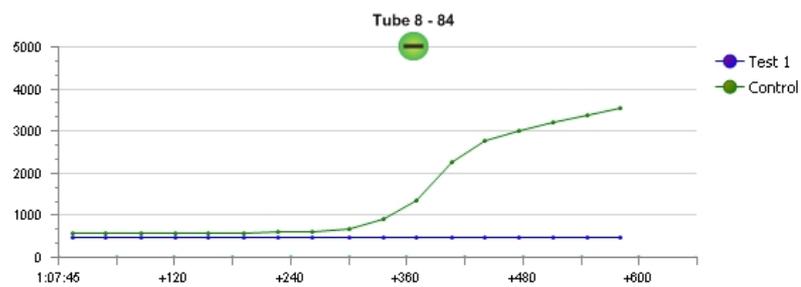
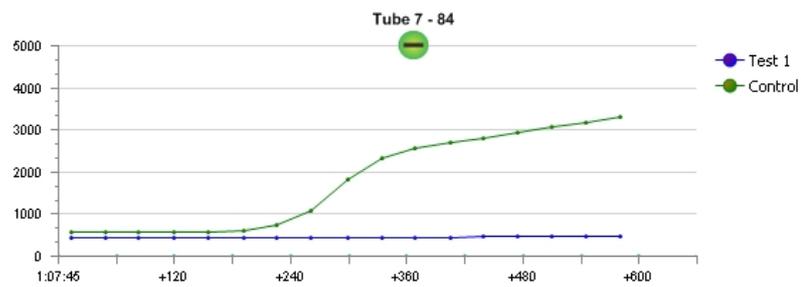
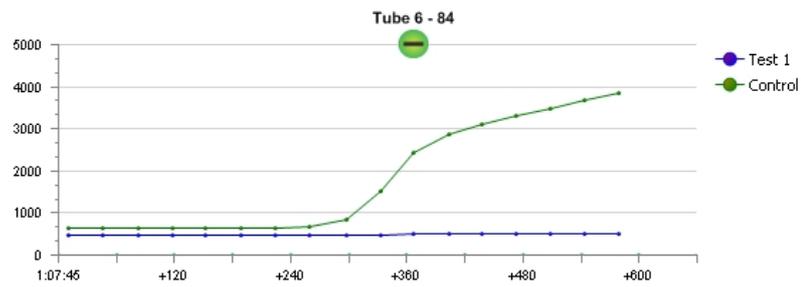
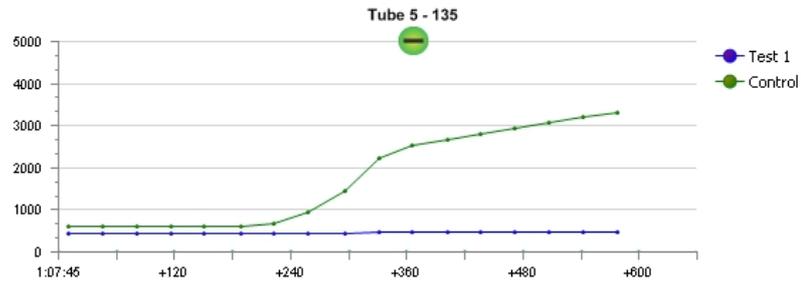


Comments

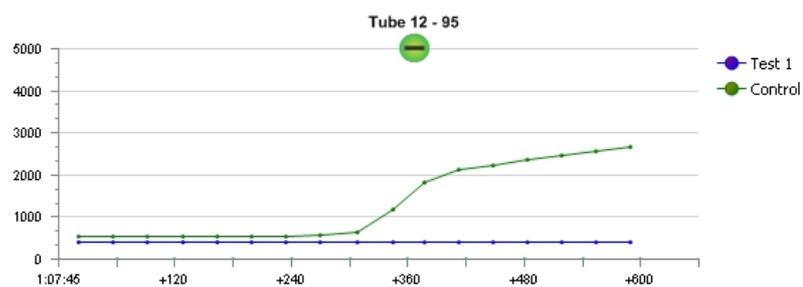
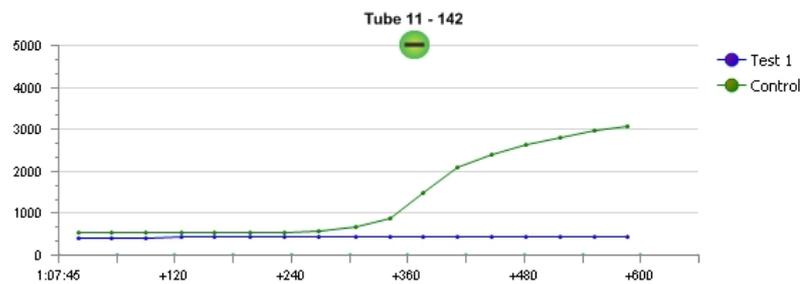
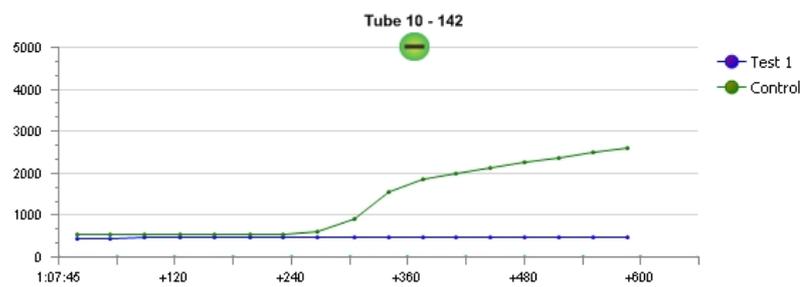
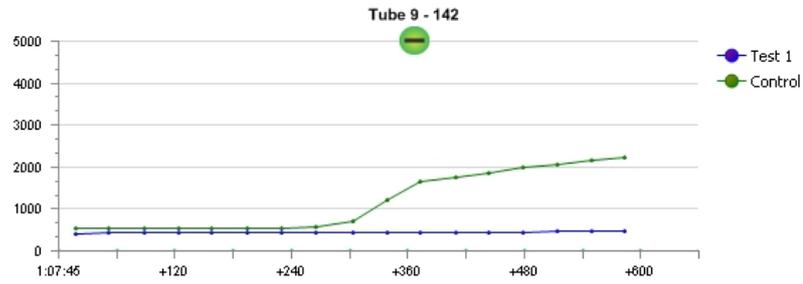
SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



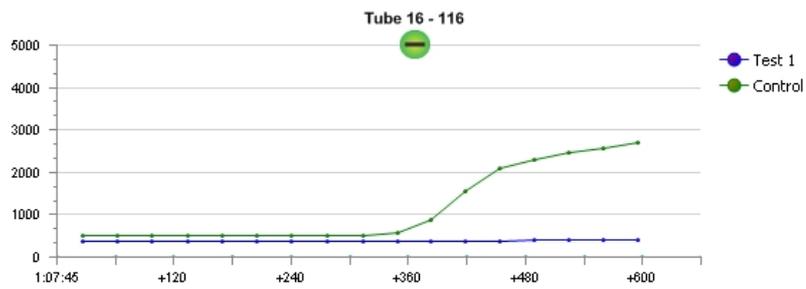
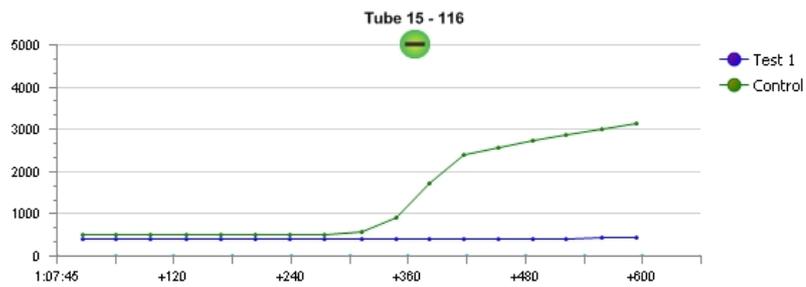
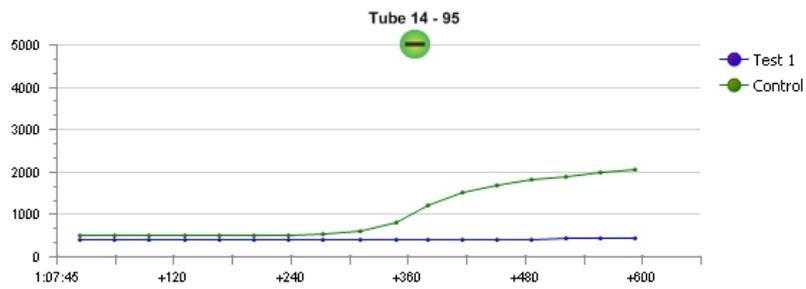
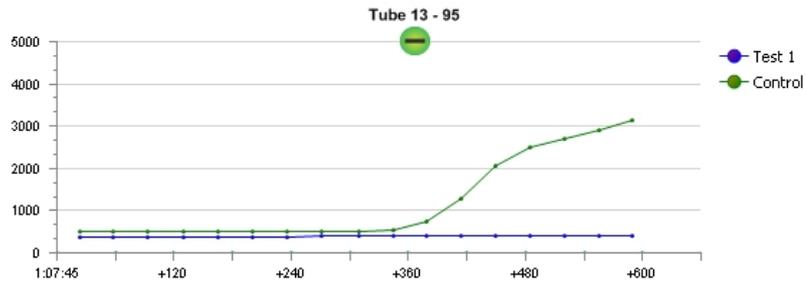
SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



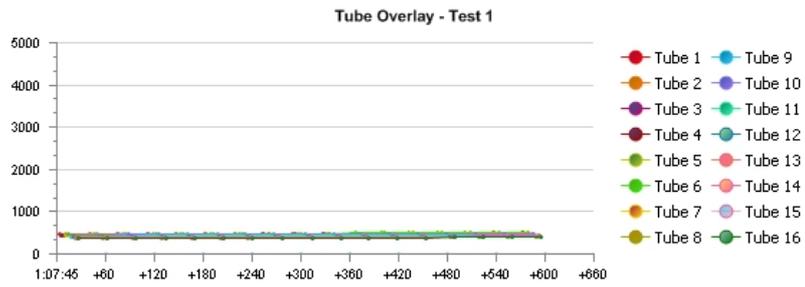
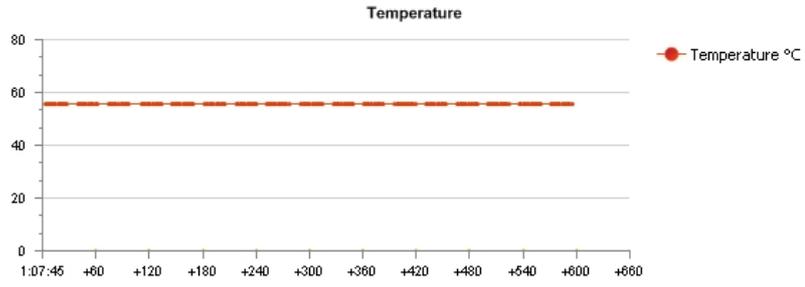
SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT

Test Detail

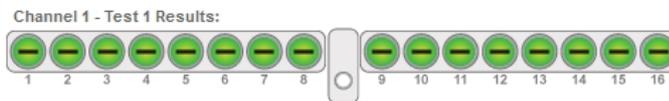
Test Type: 9822 O157:H7 Algorithm: 9822 20141031
 Set Temperatur: 56.0°C Start Time: 09/07/2016 1:22:31PM
 Instrument ID: 1A54E315
 File Name: 8.json

Test Fields

User Name: FEDERICO TAPIA
 Lot ID: TERCERO

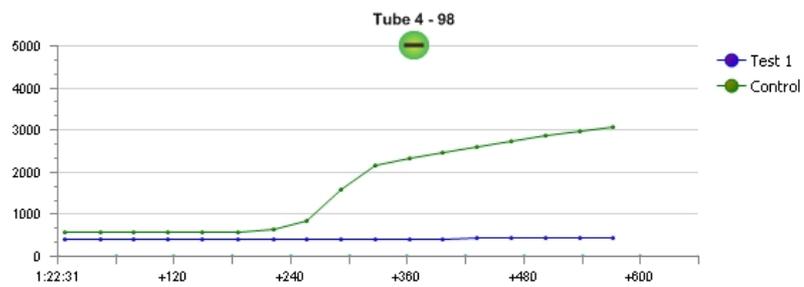
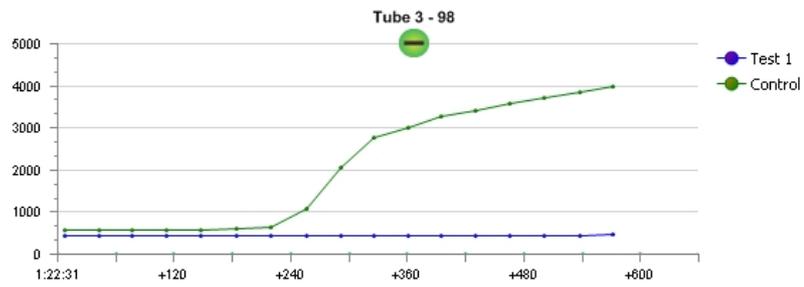
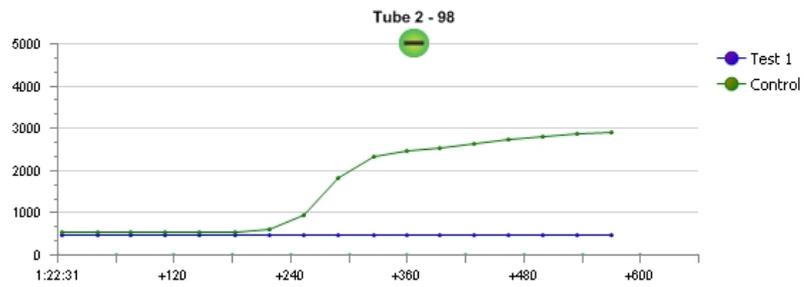
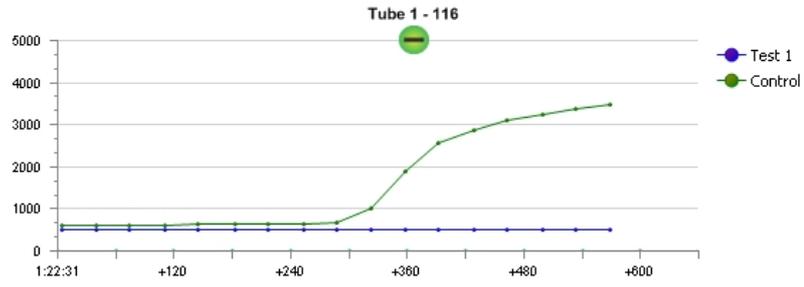
SAMPLE ID	CH1	SAMPLE ID	CH1
01. 116	Negative	09. 73	Negative
02. 98	Negative	10. 73	Negative
03. 98	Negative	11. 90	Negative
04. 98	Negative	12. 90	Negative
05. 145	Negative	13. 90	Negative
06. 145	Negative	14. 151	Negative
07. 145	Negative	15. 151	Negative
08. 73	Negative	16. 151	Negative

Test Results

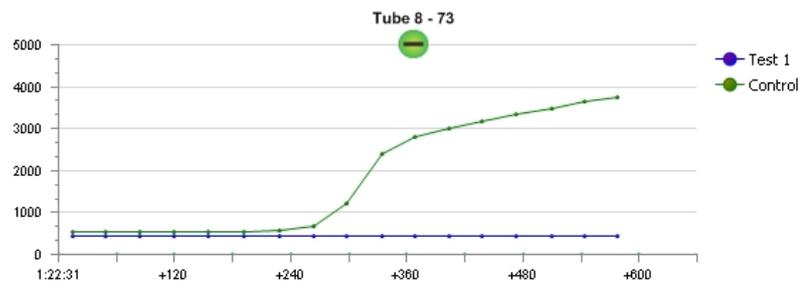
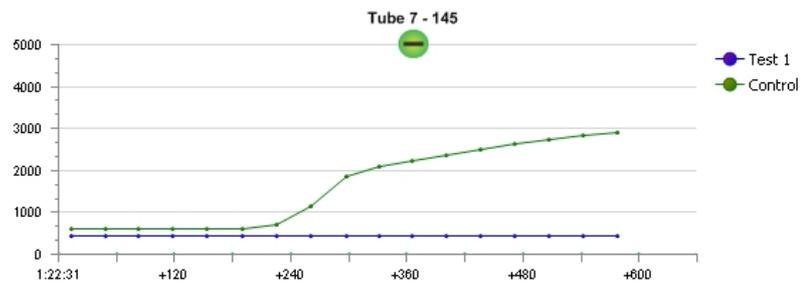
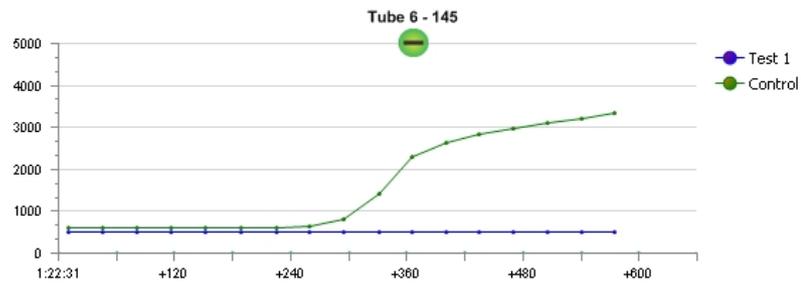
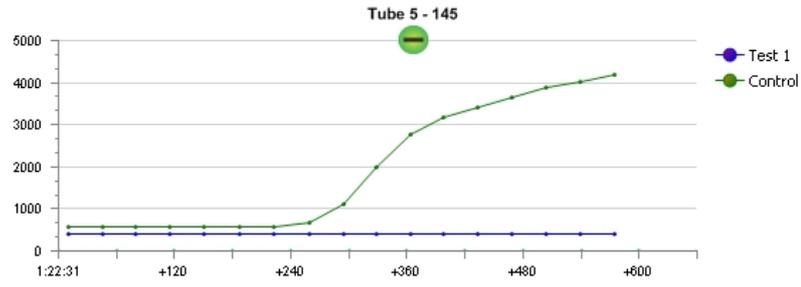


Comments

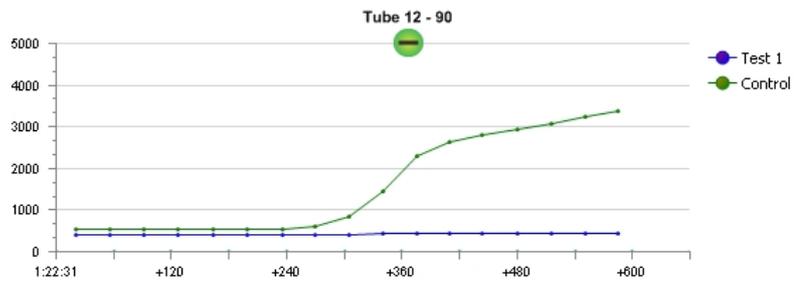
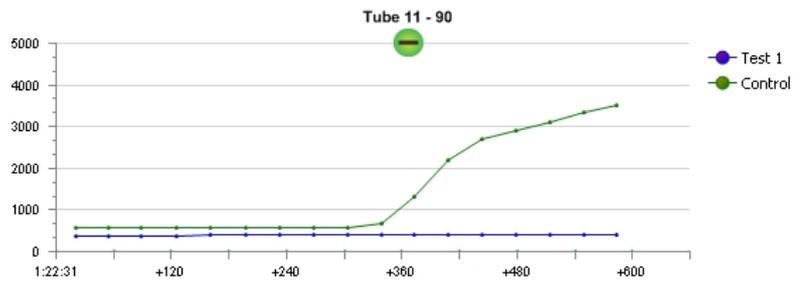
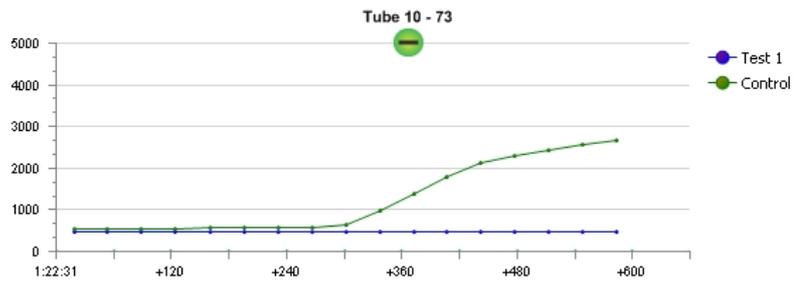
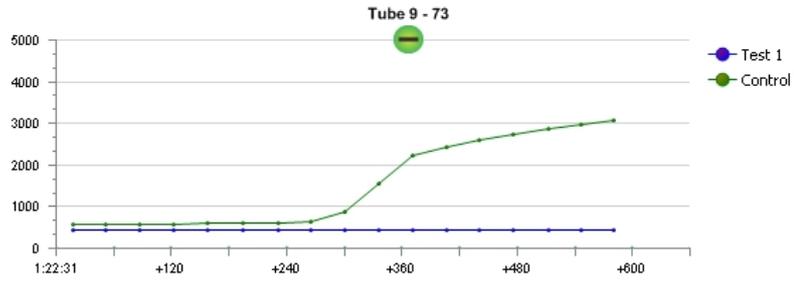
SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



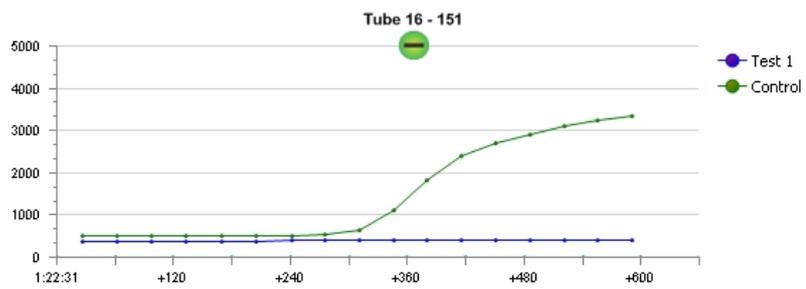
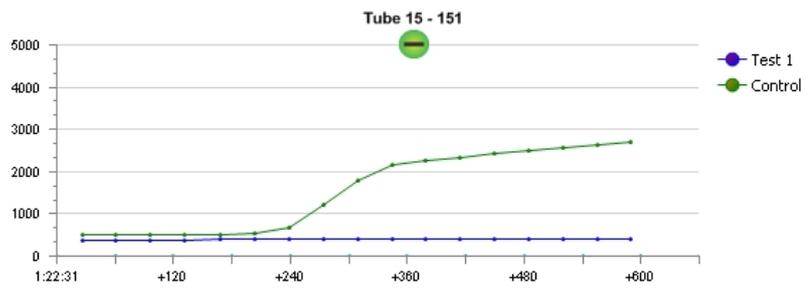
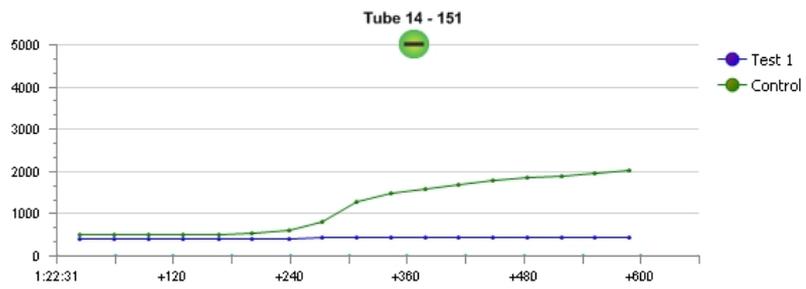
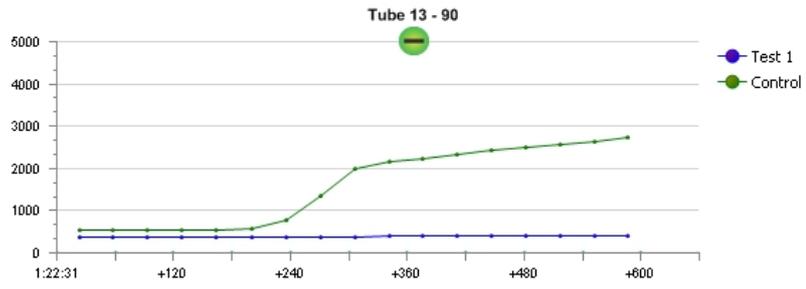
SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



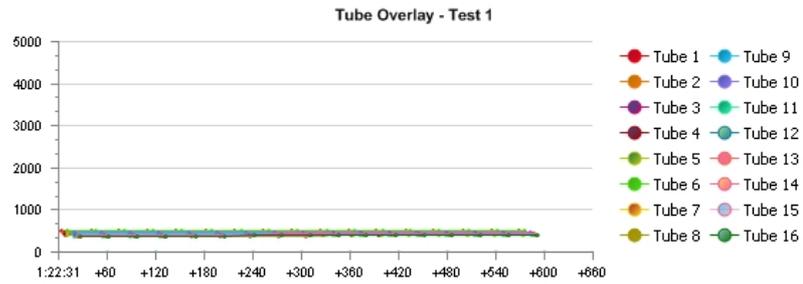
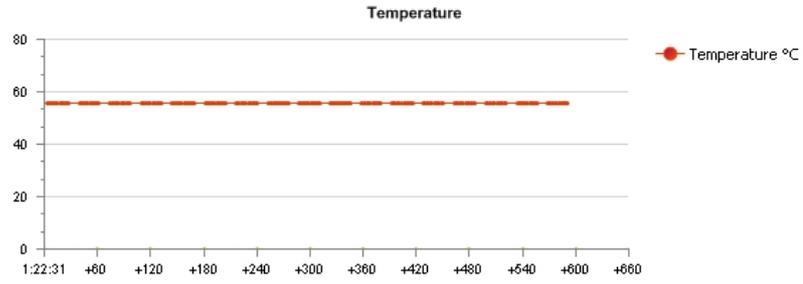
SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT

Test Detail

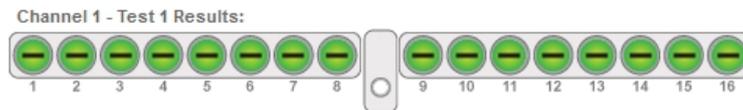
Test Type: 9822 O157:H7 Algorithm: 9822 20141031
 Set Temperatur 56.0°C Start Time: 09/07/2016 1:37:09PM
 Instrument ID: 1A54E315
 File Name: 9.json

Test Fields

User Name: FEDERICO TAPIA
 Lot ID: CUARTO

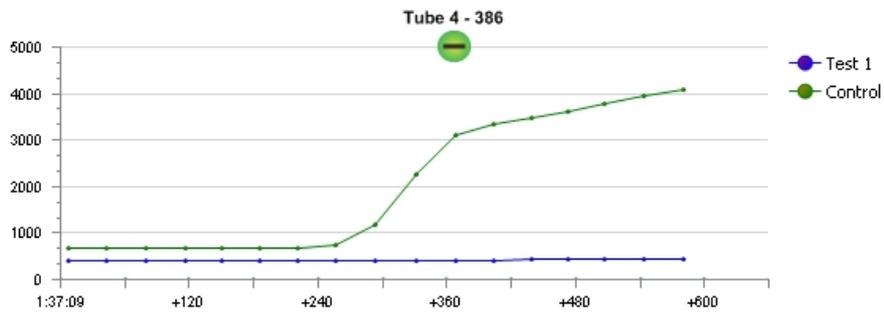
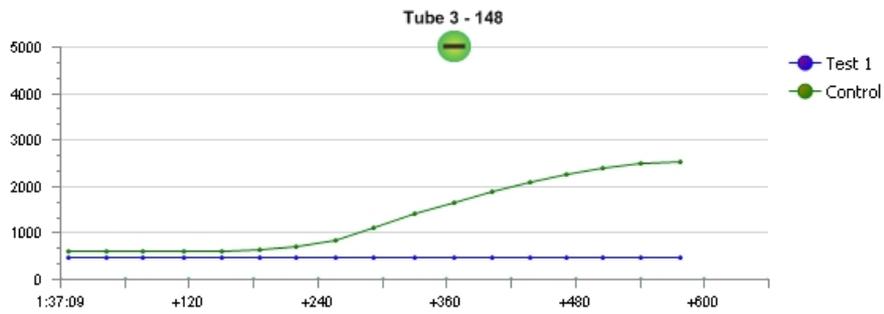
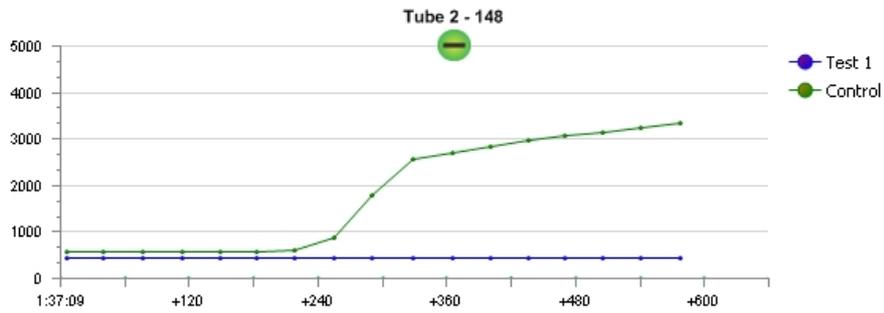
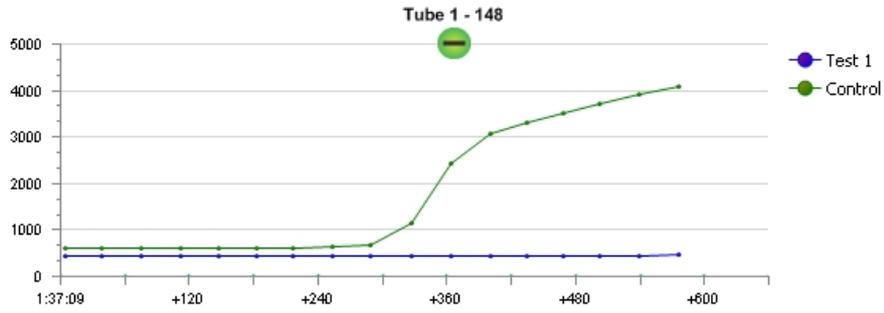
SAMPLE ID	CH1	SAMPLE ID	CH1
01. 148	Negative	09. 387	Negative
02. 148	Negative	10. 392	Negative
03. 148	Negative	11. 392	Negative
04. 386	Negative	12. 392	Negative
05. 386	Negative	13. 393	Negative
06. 386	Negative	14. 393	Negative
07. 387	Negative	15. 393	Negative
08. 387	Negative	16. 394	Negative

Test Results

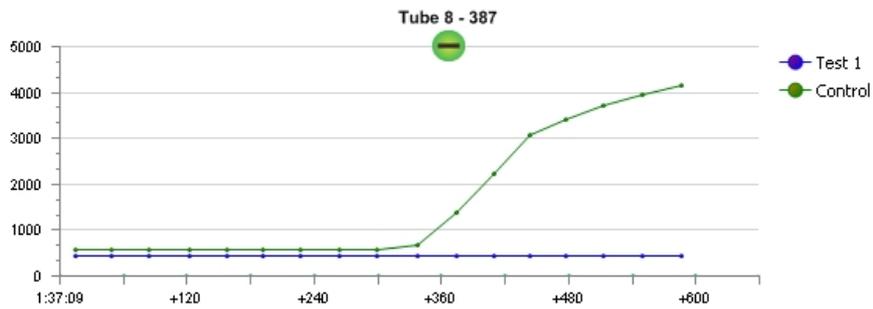
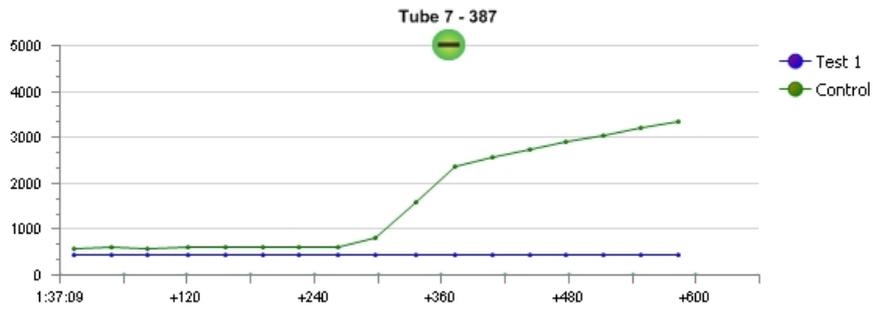
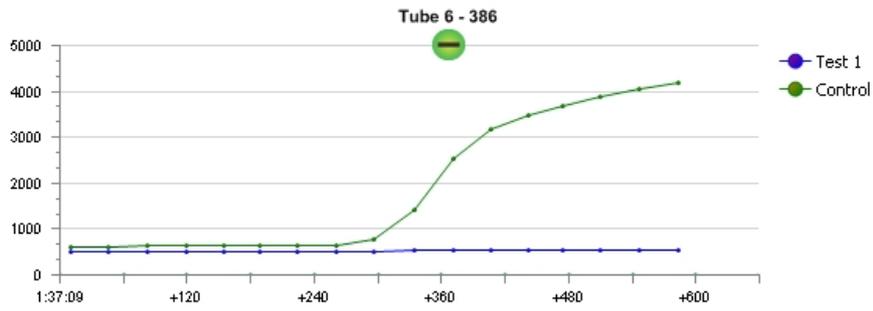
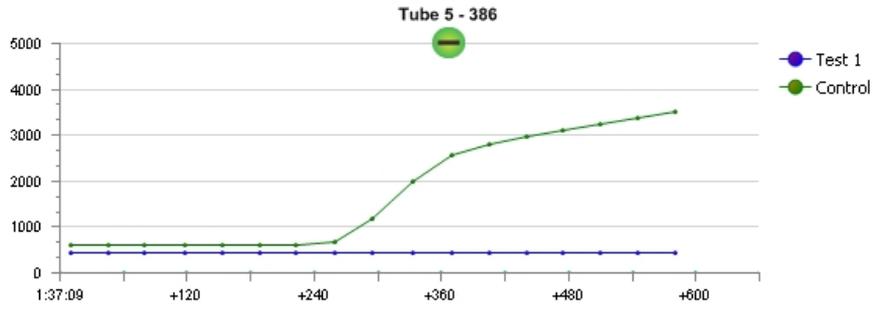


Comments

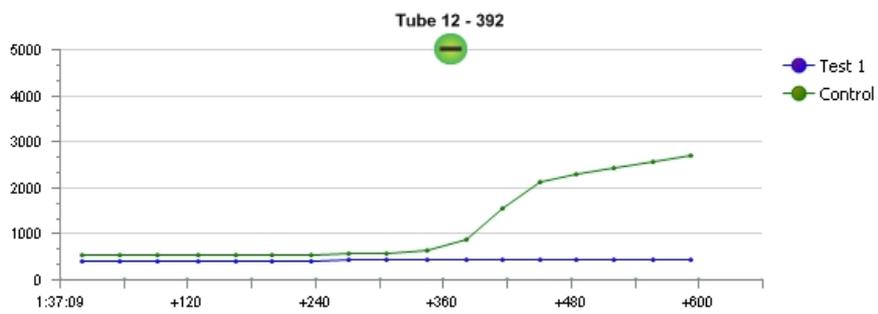
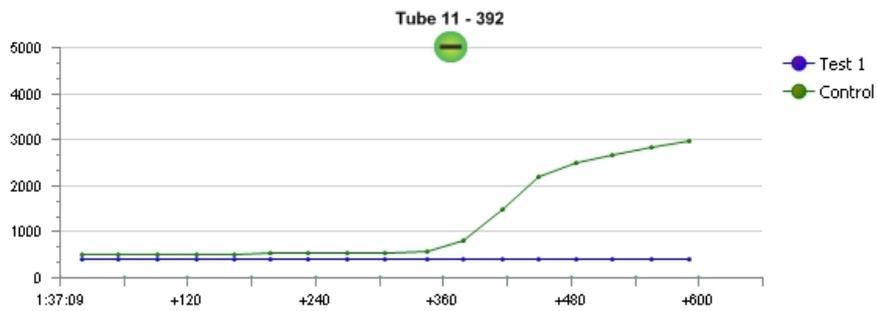
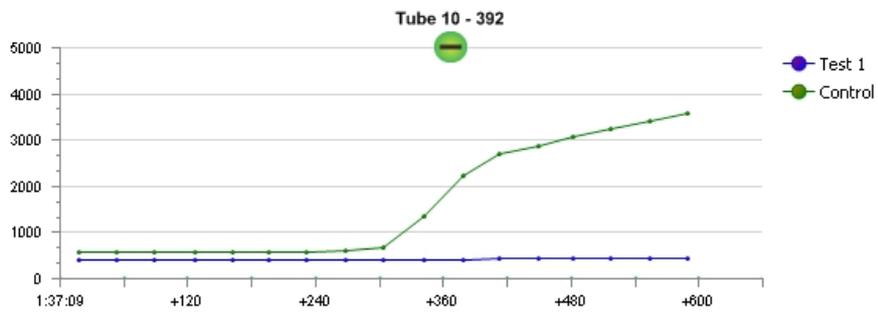
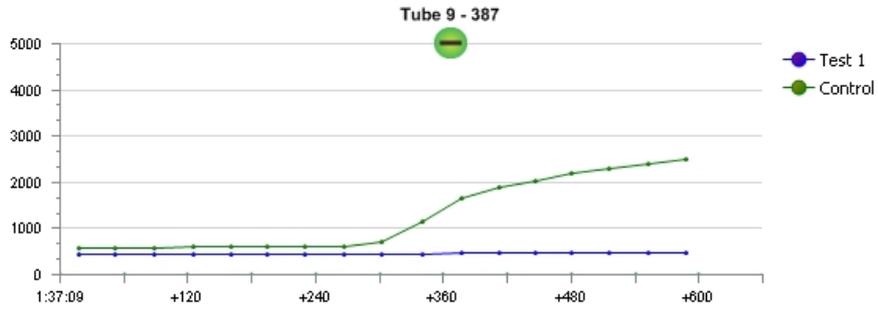
SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



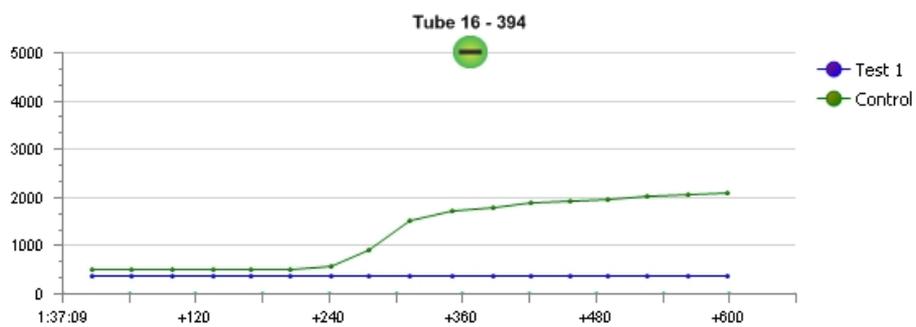
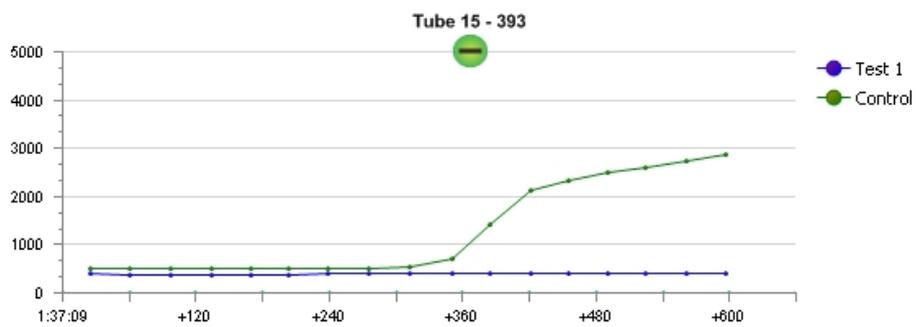
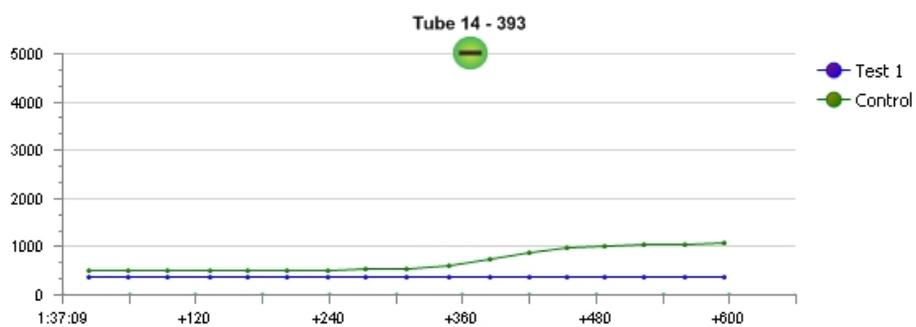
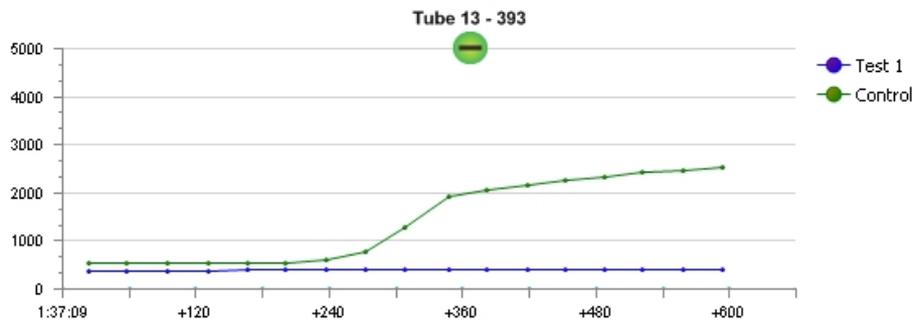
SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



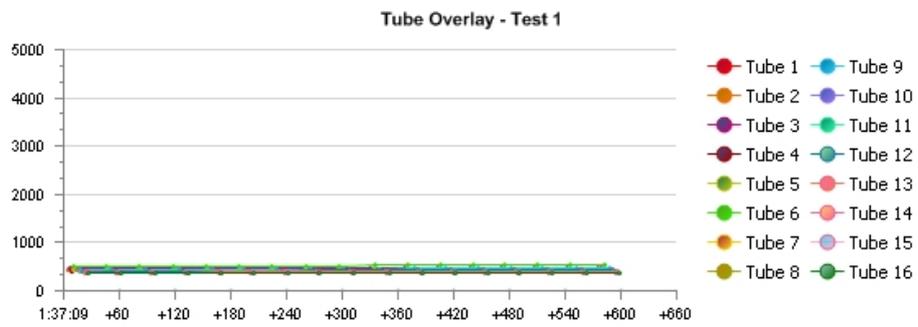
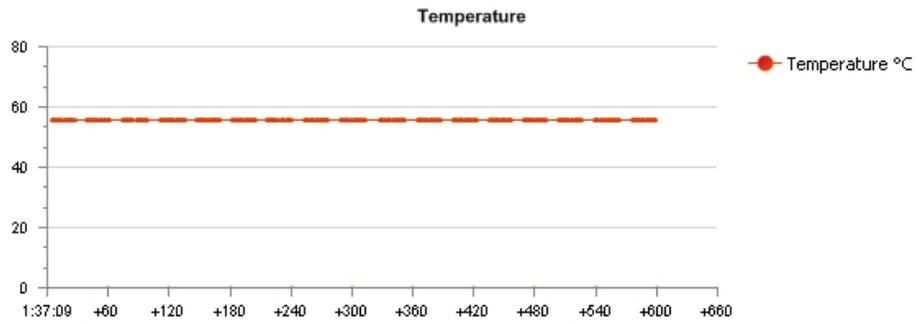
SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT

Test Detail

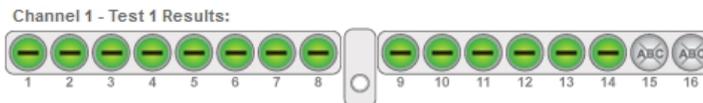
Test Type: 9822 O157:H7 Algorithm: 9822 20141031
 Set Temperatur 56.0°C Start Time: 09/07/2016 1:52:12PM
 Instrument ID: 1A54E315
 File Name: 10.json

Test Fields

User Name: FEDERICO TAPIA
 Lot ID: QUINTO

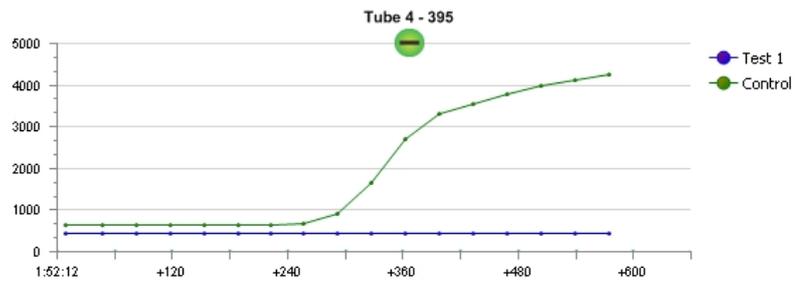
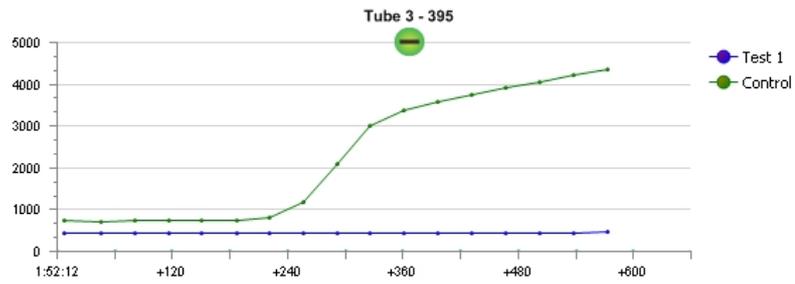
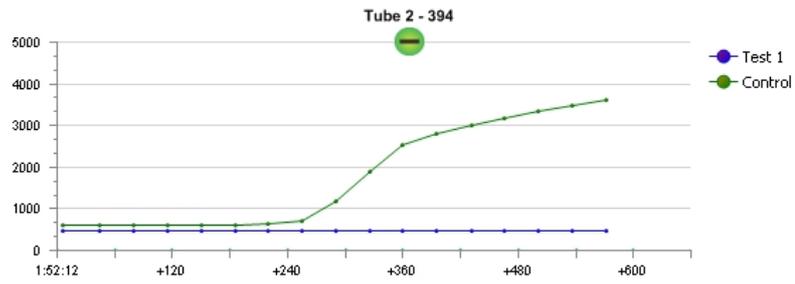
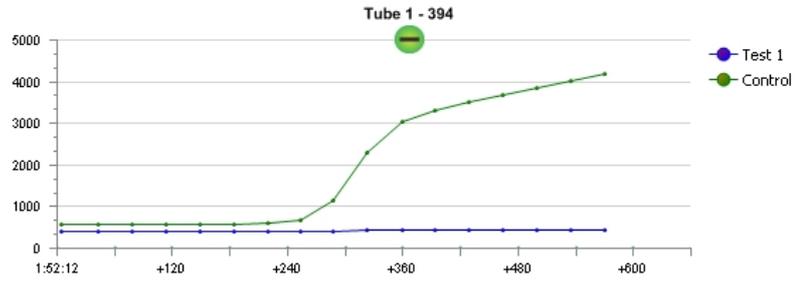
SAMPLE ID	CH1	SAMPLE ID	CH1
01. 394	Negative	09. 337	Negative
02. 394	Negative	10. 337	Negative
03. 395	Negative	11. 337	Negative
04. 395	Negative	12. 23	Negative
05. 395	Negative	13. 23	Negative
06. 335	Negative	14. 23	Negative
07. 335	Negative	15.	
08. 335	Negative	16.	

Test Results

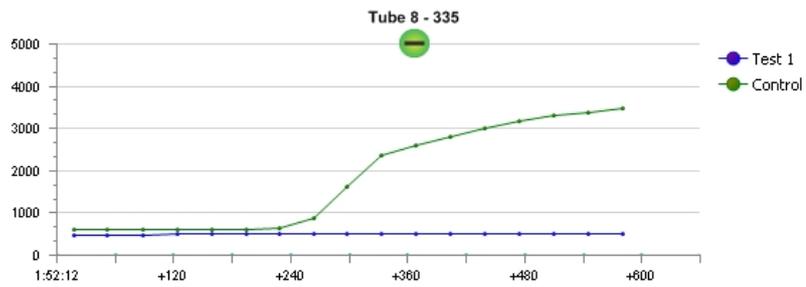
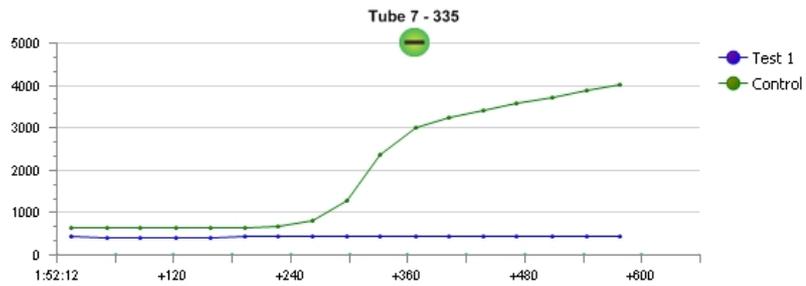
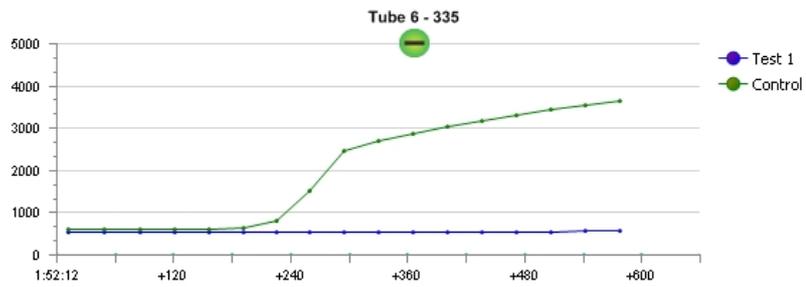
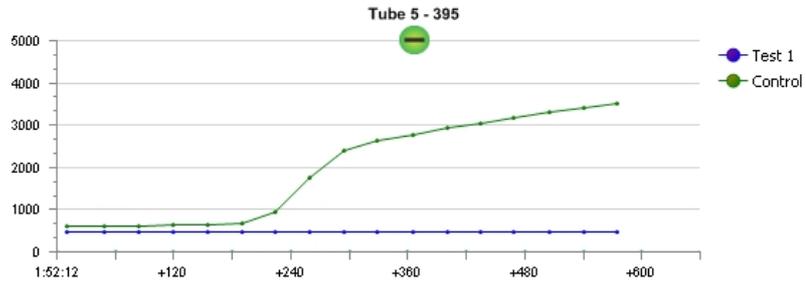


Comments

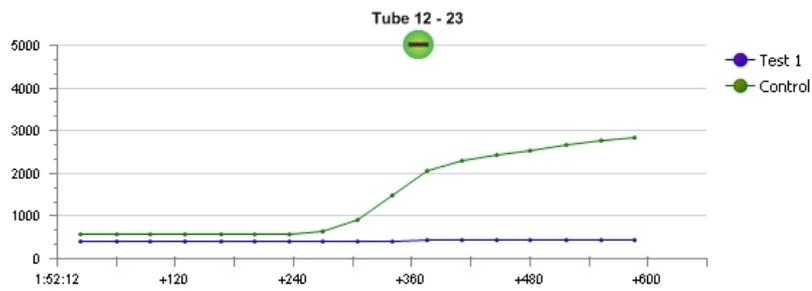
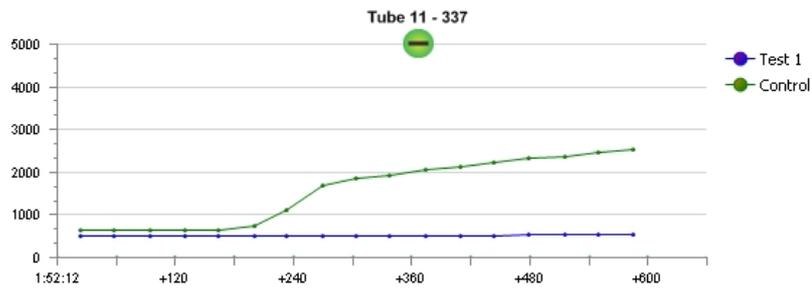
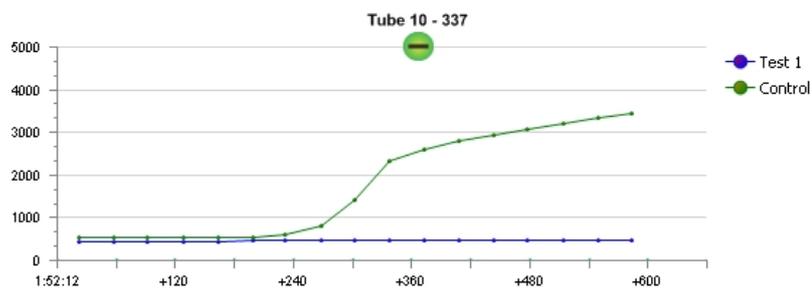
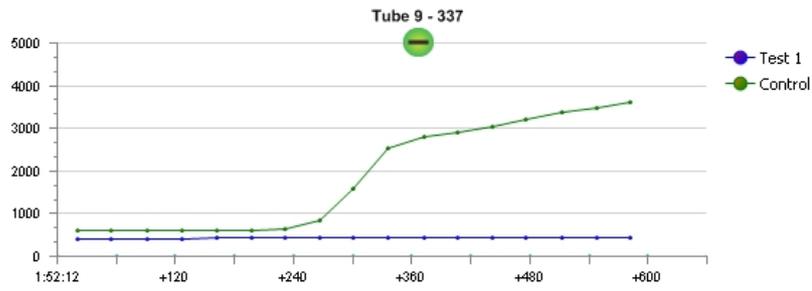
SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



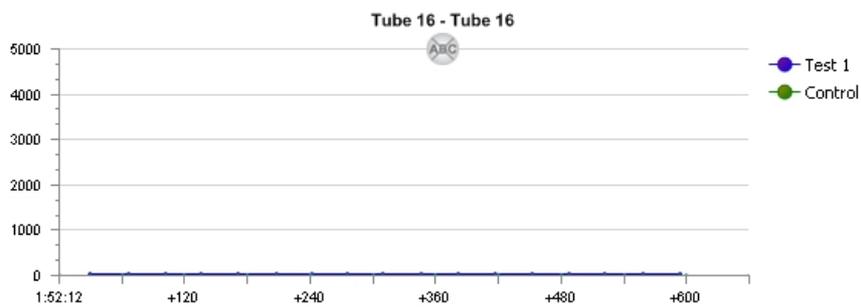
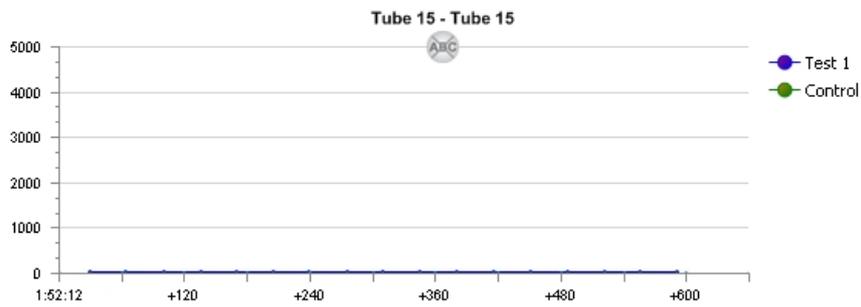
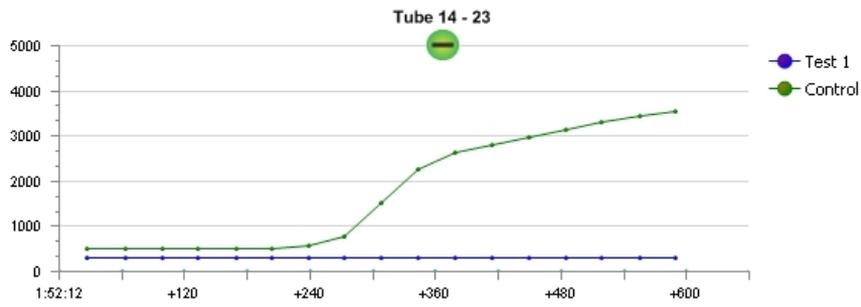
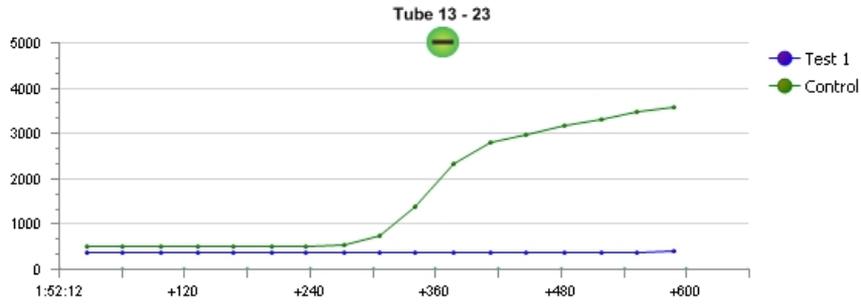
SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



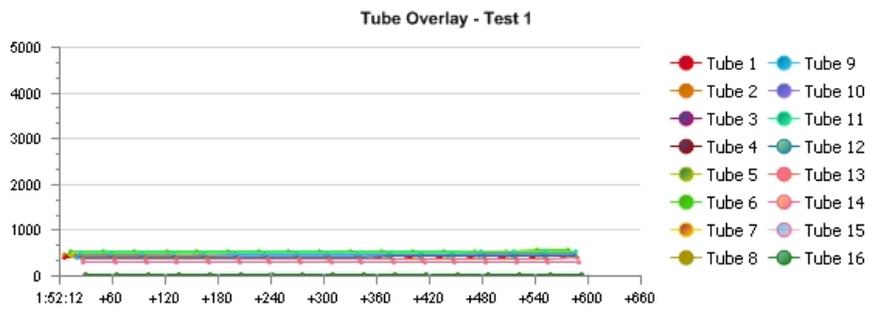
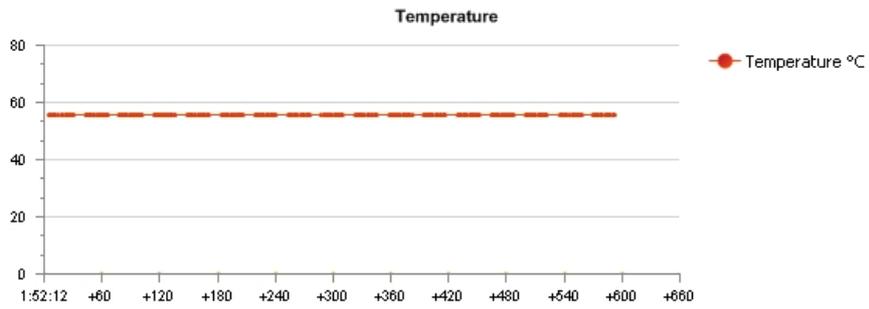
SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



SUMMARY TEST & TUBE GRAPHS REPORT



Anexo 10. Registro de socialización del Instructivo de Buenas Prácticas de Manufactura.

ACTA DE ASISTENCIA

No.	NOMBRE Y APELLIDO	CC	EMPRESA/ ORGANIZACIÓN	TÉLEFONO	CORREO	FIRMA
	Abraham Gutierrez	00380121	Arenal	4058584		
	Angel Jara	010184994	Arenal	4073388		
	Esperanza Mata	019016676	Arenal	4095511		
	Ricard Jesús	010283160	Arenal	4095606		
	Janneth Chiribó	010468349	Arenal	4038239		
	Yamir Tamín	010573175	Arenal	4071092		
	Beis Chica	010181630	Arenal	4093571		
	Carla Alicia	010177744	Arenal	4083144		
	Catalina Crespo	010302295	Arenal	4056954		
	María Jesús	010209264	Arenal	0983497366		
	Luisa Tora	010294777	Arenal	4093614		
	Miriam Esperanza Rojas Ch.	010440071	Arenal	9386084		
	Delia Compañi	010450509	Arenal	0999971147		
	Paola Espinosa	010244296	Arenal	0993054028		
	Vanessa Illesca	01043516011	Arenal	8385527		
	Maritza Gutierrez	01051547	Arenal	0995208896		
	Franco Cedillo	010269499	Arenal	099727248		
	Catalina Crespo	010266544	Arenal	099922674		
	María Esperanza Rojas	010285162	Arenal			
	Juan Sanchez	0104523-2	Arenal			

ORGANIZA: ADMINISTRACION DEL ARENAL INSTRUCTOR: RAFAEL TAPIA JARA
 EVENTO: OPERACION DEL INSTRUCTIVO DE BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA
 CIUDAD: OROCA LUGAR: TIENA URBENHERADO EL ARENAL
 FECHA: 29-07-2016 HORA: 15:30



Cuenca 29 de Julio del 2016.

Sr. Wellington Quiroga.
 Director del Mercado el Arenal.
 Su Despacho.

Por medio de la presente me dirijo a Usted para realizar la propuesta de capacitaciones por parte de la Agencia Nacional de Regulación Control Vigilancia Sanitaria (ARCSA) una vez que han sido socializados los resultados de los análisis realizados a las muestras de carne molida tomadas en el mercado el Arenal.

El cronograma está dirigido los propietarios y empleados de las terceras los temas a tratar son de transporte, almacenamiento, manipulación de alimentos, limpieza y desinfección.

CRONOGRAMA DE CAPACITACIONES.				
	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE
TRANSPORTE DE CARNE				
ALMACENAMIENTO DE ALIMENTOS				
MANIPULACIÓN DE ALIMENTOS				
LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN				

ATT:


 Dr. Federico Tapia J.



