



UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

INGENIERIA EN ALIMENTOS

Proyecto de Investigación previo a
la obtención del título de
Ingeniero en Alimentos

TEMA DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

CARGA MICROBIOLÓGICA DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO DE
ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO EN LA PLANTA PROCESADORA “CE-CE-PE”
UBICADA EN EL CANTÓN “FLAVIO ALFARO” DE LA PROVINCIA DE MANABÍ.

AUTOR:

OMAR GREGORIO AVILES ALVAREZ

AUSPICIO ACADÉMICO:

ING. ZOOT. ORLY CEVALLOS FALQUEZ MSC

QUEVEDO – LOS RIOS -- ECUADOR

2016

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Omar Gregorio Aviles Alvarez** declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.

Omar Gregorio Aviles Alvarez
C.C. 094105751-5
AUTOR

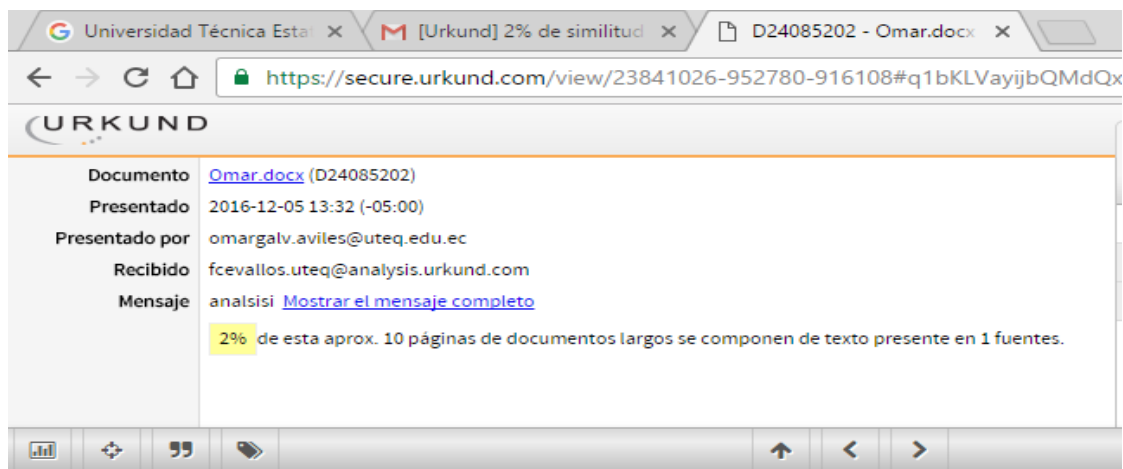
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

El suscrito, Ing. Orly Cevallos Falquez M.Sc. Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el estudiante **Omar Gregorio Aviles Alvarez** , realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado, **“CARGA MICROBIOLÓGICA DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO EN LA PLANTA PROCESADORA “CE-CE-PE” UBICADA EN EL CANTÓN “FLAVIO ALFARO” DE LA PROVINCIA DE MANABÍ”** previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Orly Cevallos Falquez M.Sc
DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICACIÓN DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.

Dando cumplimiento al Reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a las normativas y directrices establecidas por el SENESCYT, El suscrito, **Ing. Orly Cevallos Falquez M.Sc.**, en calidad de Director del Proyecto de Investigación de Grado “**CARGA MICROBIOLÓGICA DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO EN LA PLANTA PROCESADORA “CE-CE-PE” UBICADA EN EL CANTÓN “FLAVIO ALFARO” DE LA PROVINCIA DE MANABÍ**”, de autoría del estudiante **Omar Gregorio Aviles Alvarez**, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es de 2%, el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.



Ing. Orly Cevallos Falquez M.Sc.
DIRECTORA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

“CARGA MICROBIOLÓGICA DE LAS DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO EN LA PLANTA PROCESADORA “CE-CE-PE” UBICADA EN EL CANTÓN “FLAVIO ALFARO” DE LA PROVINCIA DE MANABÍ”

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos.

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Raúl Díaz Ocampo, PhD

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Ángel Fernández.M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Verónica Puente. M.Sc.

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2016 – 2017

Contenido

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN. ...	iii
CERTIFICACIÓN DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.....	iv
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
CÓDIGO DUBLIN.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	2
1. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	2
1.1. Problema de investigación.	3
1.1.1. Planteamiento del problema.	3
1.1.2. Formulación del problema.....	4
1.1.3. Sistematización del problema.	4
1.2. Objetivos.	4
1.2.1. Objetivo general.	4
1.2.2. Objetivos específico.	5
1.3. Justificación.....	5
1.4. Hipótesis.....	6
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
2.1. Marco conceptual.	8
2.1.1. Queso fresco.	8
2.1.2. Inocuidad Alimentaria.	8
2.1.3. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	8
2.1.4. Causas de las enfermedades trasmitidas por los alimentos.	8

2.1.4.1. Origen Biológico.	9
2.1.5. Principales características de algunas enfermedades transmitidas por alimentos de origen biológico.	9
2.2. Marco referencial.	10
2.2.1. Producción de leche en el Ecuador.	10
2.2.2. Producción lechera en la provincia de Manabí.	10
2.2.3. Producción lechera y quesera en el cantón Flavio Alfaro.	11
2.2.4. Instalaciones para la producción de queso fresco.	11
2.2.4.1. Diagrama de flujo del queso fresco pasteurizado.	12
2.2.5. Descripción del proceso de queso fresco.	13
2.2.6. Características de la leche destinada a la elaboración de queso.	15
2.2.6.1. Requisitos físico-químicos.	15
2.2.7. Requisitos microbiológicos.	16
2.2.8. Valor nutricional del queso fresco.	16
2.2.9. Principales patógenos encontrados en los quesos frescos.	16
2.2.9.1. Echerichia coli.	16
2.2.9.2. Staphylococcus aureos.	17
2.2.9.3. Salmonella ssp.	18
2.2.9.4. Mohos y levaduras.	18
2.2.9.5. Levaduras.	18
2.2.9.6. Mohos.	18
2.3. Marco legal.	19
2.3.1. Norma codex para el queso (Codex Standard 283-1978).	19
2.3.1.1. Ámbito de aplicación.	19
2.3.1.2. Descripción.	19

2.3.1.3. Higiene.	20
2.3.2. Instituto ecuatoriano de la normalización (INEN).	20
2.3.2.1. NTE 1528 (2012) Norma general para quesos frescos no maduros.	20
CAPÍTULO III	22
3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	22
3.1. Localización.	23
3.2. Tipo de investigación.	23
3.3. Método de investigación.	23
3.4. Recopilación de información.	23
3.5. Instrumentos de la investigación.	24
3.6. Recursos humanos y materiales.	24
3.6.1. Recursos humanos.	24
3.6.2. Recursos de laboratorio.	24
3.6.3. Recursos Biológicos.	24
3.6.4. Recursos Químicos.	24
3.7. Muestreo.	25
3.8. Evaluación microbiológica.	25
3.8.1. Determinación de Salmonella spp. (NTE INEN 1529-15:2009).	26
3.8.2. Determinación de coliformes fecales y E.coli (NTE INEN 1529- 8).	27
3.8.3. Detección de recuento Staphylococcus aureus. (NTE INEN 1529-14:98).	28
CAPÍTULO IV	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	30
4.1. Resultados y discusión.	31
4.1.1. Diagnóstico de la planta procesadora “CE-CE-PE”	31

4.1.1.1. Flujograma de proceso de elaboración de queso fresco de la planta procesadora “CE-CE-PE”	31
4.1.1.2. Edificación e instalaciones	32
4.1.1.3. Higiene de equipos, utensilios, pisos y personal.	33
4.1.1.4. Productos tóxicos.....	33
4.1.1.5. Control del ambiente y de plagas	33
4.1.1.6. Almacenamiento y transporte	34
4.1.2. Evaluación Microbiológica de la Elaboración del Queso fresco.....	34
4.1.2.1. Recuento de moho y levadura	34
4.1.2.2. Recuento de Staphylococcus aureus.....	35
4.1.2.3. Determinación del NMP de coliformes totales.....	36
4.1.2.4. Determinación E. coli y salmonella.	38
4.1.2.5. Análisis estadístico T Student.	39
CAPÍTULO V	40
5. CONCLUSION Y RECOMENDACION	40
5.1. Conclusiones	41
CAPÍTULO VI	43
6. BIBLIOGRAFIA	43
Bibliografía.	44
CAPITULO VI	48
7. ANEXOS	48

Contenido de Tablas.

Tabla 1. Diagnóstico de la Problematización.....	3
Tabla 2. Requisito físico-químico de la leche cruda.....	15
Tabla 3. Requisitos microbiológicos de la leche cruda tomada en hato.....	16
Tabla 4. Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados.....	21
Tabla 5. Recuento de moho y levadura.....	35
Tabla 6. Recuento de Staphylococcus aureus.....	36
Tabla 7. Determinación del NMP de coliformes totales.....	37
Tabla 8. Determinación de E. coli y salmonella.....	38
Tabla 9. Análisis estadístico T Student de las muestras leche cruda y queso.....	39

AGRADECIMIENTO

Mis más sinceros agradecimientos:

A Dios por darme la vida, las fuerzas y la fé necesarias para no rendirme nunca y luchar día a día por alcanzar mis objetivos, no me cabe duda que sin sus bendiciones no hubiera logrado este sueño tan anhelado.

A mis queridos padres Jaime Aviles y Jenny Alvarez, quienes me inculcaron buenos valores desde pequeño y la importancia del estudio, por sus esfuerzos y constancia en brindarme su apoyo incondicionalmente, logrando que fuera posible la culminación de mi carrera.

A mis hermanos, Jaime Aviles, Jenny Aviles y Elkin Aviles, por su apoyo moral y cariños sinceros, que con sabios consejos y apoyo moral e incondicional también forman parte de este logro obtenido.

A mi cuñado y amigo, Hugo Sánchez, que, con sabios consejos y apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, siempre me ha ayudado a conseguir mis objetivos y este es uno más que comparto con él.

A mi director de tesis el Ing. Orly Cevallos por su amistad e importante participación y aporte en el desarrollo de esta tesis.

A la Ing. Verónica Puente y al Ing. Ángel Fernández, Le agradezco por todo el apoyo brindado en el mejoramiento de mi investigación, por su tiempo, amistad y por los conocimientos transmitidos.

Al Ing. Raúl Díaz le agradezco por todo el apoyo brindado a lo largo de la carrera, por su tiempo, consejos y por los conocimientos transmitidos en el salón de clases.

Gracias también a mis amigos y compañeros: Miguel Carrión, Israel Ruiz, Adrián Zamora y Daniela Lindao, por brindarme su valiosa amistad y ayudarme incondicionalmente durante estos 5 años de estudio a alcanzar la culminación de mi carrera.

DEDICATORIA

Con todo mi afecto dedico este trabajo de investigación:

A mis padres, Jaime Aviles y Jenny Alvarez quienes son el motivo de mi inspiración, ya que son ejemplo de trabajo, honradez y sacrificio, gracias por su apoyo incondicional, por sus sabios consejos; enseñándome que el esfuerzo, la constancia y la perseverancia, son las claves para alcanzar el éxito.

A mis queridos hermanos Jaime, Jenny y Elkin por su apoyo incondicional y cariño sincero; a mis adorados abuelos (a), tíos, tías, primos y primas que con sabios consejos y apoyo moral e incondicional también forman parte de este logro obtenido.

RESUMEN

Se planteó una investigación cuyo objetivo fue evaluar la carga microbiológica de las diferentes etapas del proceso de elaboración de queso fresco en la planta procesadora “CE-CE-PE” Ubicada en el cantón “Flavio Alfaro” de la provincia de Manabí. Las muestras fueron: a) leche cruda, leche pasteurizada, cuajada y queso al final del proceso en la planta (fase de despacho), b) agua de servicio tomada en diversos puntos dentro del área de procesos. c) materiales utilizados al inicio del proceso y al final después de la limpieza (tinas, mesa de trabajo, moldes, lira, palas, lienzo. d) manos de operarios. Esta toma de muestras se realizará 2 veces en las diferentes etapas del proceso durante todo el procesamiento. Los análisis microbiológicos se realizaron según Normas INEN como: *coliformes fecales*, *E. coli*, *mohos*, *levaduras*, *salmonella* y *Staphylococcus aureos*. Se evidencio que, aunque la pasteurización demostró ser eficiente en la destrucción de microorganismos y la utilización de sal en los quesos destruyen la mayor parte de los microorganismos presentes en la cuajada, en el proceso de fabricación del queso existen deficientes prácticas de manufactura, así como en los procedimientos de higiene de los materiales y operarios, por lo tanto la Planta debe adoptar las medidas correctivas correspondientes a las deficiencias halladas.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the microbiological load of the different stages of the process of processing fresh cheese in the processing plant "CE-CE-PE" Located in the "Flavio Alfaro" Canton of the province of Manabí. The samples were: a) raw milk, pasteurized milk, curd and cheese at the end of the process in the plant (dispatch phase), b) service water taken at various points within the process area. C) materials used at the beginning of the process and at the end after cleaning (tubs, work table, molds, lira, shovels, canvas. This sampling will be done 2 times in the different stages of the process throughout the processing. Microbiological analyzes were performed according to INEN standards such as fecal coliforms, E. coli, molds, yeasts, salmonella and Staphylococcus aureus. It was evidenced that although pasteurisation proved to be efficient in the destruction of microorganisms and the use of salt in the cheeses destroy most of the microorganisms present in the curd, in the process of manufacture of the cheese there are deficient practices of manufacture as in the Procedures of hygiene of the materials and operators, therefore the Plant must adopt the corrective measures corresponding to the deficiencies found.

CÓDIGO DUBLIN

Título:	Carga Microbiológica de las Diferentes etapas del Proceso de Elaboración de Queso Fresco en la Planta Procesadora “Ce-Ce-Pe” Ubicada en el Cantón “Flavio Alfaro” de la Provincia de Manabí.		
Autor:	Carrión González Miguel Ángel		
Palabras clave:	moho y levaduras	Salmonella	Staphylococcus Aureus
	Escherichia coli		Análisis microbiológico
Fecha de Publicación:			
Editorial:			
Resumen	<p>RESUMEN.- Se planteó una investigación cuyo objetivo fue evaluar la carga microbiológica de las diferentes etapas del proceso de elaboración de queso fresco en la planta procesadora “CE-CE-PE” Ubicada en el cantón “Flavio Alfaro” de la provincia de Manabí. Las muestras fueron: a) leche cruda, leche pasteurizada, cuajada y queso al final del proceso en la planta (fase de despacho), b) agua de servicio tomada en diversos puntos dentro del área de procesos. c) materiales utilizados al inicio del proceso y al final después de la limpieza (tinajas, mesa de trabajo, moldes, lira, palas, lienzo. d) manos de operarios. Esta toma de muestras se realizará 2 veces en las diferentes etapas del proceso durante todo el procesamiento. Los análisis microbiológicos se realizaron según Normas INEN como: coliformes fecales, E. coli, mohos, levaduras, salmonella y Staphylococcus aureos. Se evidencio que aunque la pasteurización demostró ser eficiente en la destrucción de microorganismos y la utilización de sal en los quesos destruyen la mayor parte de los microorganismos presentes en la cuajada, en el proceso de fabricación del queso existen deficientes prácticas de manufactura así como en los procedimientos de higiene de los materiales y operarios, por lo tanto la Planta debe adoptar las medidas correctivas correspondientes a las deficiencias halladas.</p>		

ABSTRACT.- The objective of this research was to evaluate the microbiological load of the different stages of the process of processing fresh cheese in the processing plant "CE-CE-PE" Located in the "Flavio Alfaro" Canton of the province of Manabí. The samples were: a) raw milk, pasteurized milk, curd and cheese at the end of the process in the plant (dispatch phase), b) service water taken at various points within the process area. C) materials used at the beginning of the process and at the end after cleaning (tubs, work table, molds, lira, shovels, canvas. This sampling will be done 2 times in the different stages of the process throughout the processing. Microbiological analyzes were performed according to INEN standards such as fecal coliforms, E. coli, molds, yeasts, salmonella and Staphylococcus aureus. It was evidenced that although pasteurisation proved to be efficient in the destruction of microorganisms and the use of salt in the cheeses destroy most of the microorganisms present in the curd, in the process of manufacture of the cheese there are deficient practices of manufacture as in the Procedures of hygiene of the materials and operators, therefore the Plant must adopt the corrective measures corresponding to the deficiencies found.

Descripción

.....hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM

URI:

INTRODUCCIÓN

En la planta de lácteos “CE-CE-PE” ubicada en el cantón Flavio Alfaro se elabora un tipo de queso, que es el queso fresco, se lo considera fresco porque es un queso blando por su alto contenido de agua y a su vez no ha sufrido ninguna transformación ni fermentación. (1)

La planta procesadora de queso fresco “CE-CE-PE”, procesa alrededor de 6.000 litros de leche diarios siendo esta la responsable de la mayor producción de queso en el cantón Flavio Alfaro.

El queso fresco ha estado comprometido como vehículo de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). (2) En un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), los derivados lácteos como el queso ocupa el quinto lugar entre los alimentos que frecuentemente ocasionan enfermedades entre países sudamericanos como el Ecuador, ya que son alimentos que por su alto contenido nutricional y bajo costo son consumidos comúnmente. (3)

Entre los microorganismos más comunes en los quesos frescos están *coliformes fecales*, *E. coli*, *mohos*, *levaduras*, *salmonella* y *Staphylococcus aureus*. La presencia de estos microorganismos no solo depende de la salud de la ubre de la vaca, también corresponde al tratamiento térmico de la leche, la higienización de los equipos y materiales usados para quesería, la calidad de los cultivos, la manipulación de la cuajada durante el procesamiento, de la temperatura de almacenamiento, del transporte y de la manipulación durante la distribución del queso. (4)

Entre las enfermedades provocadas por estas bacterias se encuentran la salmonelosis, intoxicación estafilocócica y diarrea provocada por *E. coli*, provocando múltiples síntomas como dolor abdominal, diarreas, dolor de cabeza, vómitos y si no son tratados a tiempo puede provocar la muerte de la víctima. (5)

Por estas razones en la presente investigación se realizaron análisis a las diferentes etapas del procesamiento de queso fresco en la micro industria “CE-CE-PE”, y con ello tomar las medidas de prevención para garantizar una buena calidad del producto, alargar la vida útil del mismo y cuidar la salud de las personas que lo consuman. (6)

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

En la planta de lácteos “CE-CE-PE” del cantón Flavio Alfaro se procesan alrededor de 6000 litros de leche diario de la cual se elabora únicamente queso fresco, cuya principal característica es su alto contenido de grasa y agua. Este tipo de queso tiene buena aceptación en el mercado y una alta demanda en la población porque es considerado un queso nutritivo; sin embargo, se presentan devoluciones del producto por la presencia de mohos y levaduras, además por tener una vida útil baja.

La planta de lácteos no cuenta con un programa de control microbiológico ni físico químico, como: POES, HACCP O BPM, por lo que se hace necesario un estudio, que permita determinar la calidad microbiológica de las diferentes etapas del procesamiento, para que sirva como base para el control y tratamiento de estas, ya que este producto es muy susceptible a ser contaminado microbiológicamente.

Tabla 1. Diagnóstico de la Problematización.

Síntomas	Causas	Pronóstico	Control al pronóstico
1) Inadecuada higienización de utensilios, materiales y el área de procesamiento.	1) Carga microbiológica que posiblemente excede el límite de la norma establecida	1) Intoxicación de la población por consumir quesos con carga microbiana alta o patógena.	1) Realizar un estudio de calidad microbiológica en cada etapa del procesamiento
2) Desconocimiento de los puntos críticos de control.	INEN.		2) Identificar las causas que generan la contaminación microbiológica en los quesos y eliminarlas.
3) Desconocimiento de las normas básicas de BPM (buenas prácticas de manufactura)	2) Quesos con pocos días de vida útil.	2) Clausura de la planta procesadora.	3) Evitar la proliferación de bacterias de deterioro y/o patógenas siguiendo normas de calidad y BPM.
	3) Posible causante de enfermedad de transmisión alimentaria (ETA).		

Fuente: Autor, 2016.

1.1.2. Formulación del problema.

¿Que calidad microbiológica tendrán los quesos frescos producidos en la planta “CE-CE-PE” en cada una de sus etapas de procesamiento?

1.1.3. Sistematización del problema.

¿Los quesos frescos tendrán presencia de algún microorganismo patógeno?

¿Qué microorganismos estarán presentes en los quesos y en cada una de las etapas de procesamiento?

¿Con que calidad microbiológica llegara la leche a la planta procesadora “CE-CE-PE”?

¿La calidad microbiológica de los quesos producidos en la planta “CE-CE-PE” Están bajo la norma de calidad microbiológica en los alimentos establecida en el Ecuador el INEN?

1.2.Objetivos.

1.2.1. Objetivo general.

- Evaluar la carga microbiológica de las diferentes etapas del proceso de elaboración de queso fresco en la planta procesadora “CE-CE-PE” Ubicada en el cantón “Flavio Alfaro” de la provincia de Manabí.

1.2.2. Objetivos específico.

- Determinar la carga microbiológica de las diferentes etapas de procesamiento del queso fresco de la planta procesadora “CE-CE-PE” Ubicada en el cantón Flavio Alfaro.
- Determinar las causas de la contaminación microbiológica de los quesos frescos producidos en la planta.
- Comparar los resultados microbiológicos de los quesos con la norma de calidad microbiológica establecida por la Republica del Ecuador (NTE INEN).

1.3. Justificación.

La demanda de queso fresco en el cantón Flavio Alfaro y cantones aledaños ha venido aumentando a lo largo de los años debido a su valor nutritivo y su utilización tan indispensable en las costumbres gastronómicas ecuatorianas. Por esta razón hay perspectivas de ampliar aun más la producción, para ello, se hace necesario un plan de control de calidad microbiológica y uniformidad del producto final.

El procesamiento y métodos de higienización utilizados actualmente por la planta procesadora “CE-CE-PE” no garantizan un producto que cuide la salud de los consumidores.

Por ende, la presente investigación permitirá conocer la calidad microbiológica del queso fresco y cada una de sus etapas para así adquirir los resultados que permitirán estimar las causas de contaminación que originan el deterioro acelerado de los quesos, y con ello tomar las medidas de prevención para garantizar una buena calidad del producto, alargar la vida útil del mismo y cuidar la salud de las personas que lo consuman.

1.4.Hipótesis

H₀ En el queso producido en la planta procesadora CE-CE-PE no hay existencia de *salmonella* de acuerdo con las normas NTE INEN- 1528.

H₁ En el queso producido en la planta procesadora CE-CE-PE hay existencia de *salmonella* de acuerdo con las normas NTE INEN- 1528.

H₀ En la planta procesadora CE-CE-PE se puede diagnosticar presencia de E. coli en los quesos producidos que este fuera de lo permisible de acuerdo a las normas NTE INEN-1528.

H₁ En la planta procesadora CE-CE-PE se puede diagnosticar presencia de E. coli en los quesos producidos que este fuera de lo permisible de acuerdo a las normas NTE INEN-1528.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.Marco conceptual.

2.1.1. Queso fresco.

El queso fresco de acuerdo a la norma oficial Ecuatoriana NTE INEN 1528:2012, es el queso no madurado, ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular preparado con leche entera, semidescremada, coagulada con enzimas y/o ácidos orgánicos generalmente sin cultivos lácticos. También se designa como queso blanco. (6)

2.1.2. Inocuidad Alimentaria.

En su definición básica, Inocuidad Alimentaria significa la garantía de que el consumo de alimentos no cause daño a la salud de los consumidores, esto se puede alcanzar minimizando los riesgos biológicos, químicos y físicos en los procesos producción-consumo. (7)

2.1.3. Enfermedades transmitidas por alimentos.

Una enfermedad transmitida a través de los alimentos, es cualquier síndrome originado por la ingestión de productos alimenticios y/o agua que contengan agentes causales en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a escala individual o grupos de población. Estas se producen en cualquiera de las etapas de la cadena alimentaria (producción, transporte, almacenamiento elaboración, distribución y consumo de alimentos). (5)

2.1.4. Causas de las enfermedades transmitidas por los alimentos.

- Sustancias tóxicas contenidas en el propio tejido de animales y plantas; piñón de botija, toxinas marinas (ejemplo, ciguatera).
- Adición de aditivos, ejemplo nitrito.
- Metales tóxicos (mercurio, arsénio, hierro, plomo).
- Agentes químicos (plaguicidas, residuos de materiales de empaque, productos de limpieza u otros venenos).
- Origen biológico. (5)

2.1.4.1. Origen Biológico.

Cuando el origen de una enfermedad alimentaria es por un microorganismo, se clasifica en las siguientes categorías.

- **Bacterias:** Las principales bacterias patógenas causantes de la mayoría de infecciones son, *Salmonella*, *E.coli*, *Listeria*, *Campylobacter*. En menor medida, *Yersinia*, *Brucella* y *Micobacterium* también pueden contaminar los alimentos.
Algunas bacterias como *Clostridium*, *Bacillus* y *Staphylococcus* producen toxinas, responsables de las intoxicaciones en humanos
- **Virus:** Los norovirus, virus de la Hepatitis y rotavirus, ocupan el segundo lugar como responsables de las infecciones transmitidas por alimentos y bebidas.
- **Parásitos:** los principales parásitos responsables de infecciones alimentarias son *Echinococcus*, *Trichinella*, *Anisakis* y *Toxoplasma*.
- **Hongos:** *Aspergillum* y *Fusarium* son hongos que a determinadas condiciones de temperatura y humedad pueden producir micotoxinas contaminando los alimentos y causando intoxicaciones a largo plazo. (8)

2.1.5. Principales características de algunas enfermedades transmitidas por alimentos de origen biológico.

Salmonelosis.

Es una infección en el revestimiento del intestino delgado causada por la bacteria *salmonella*. La infección por *salmonella* es uno de los tipos más comunes de intoxicación alimentaria y ocurre cuando se consume alimentos o agua que contienen la bacteria *salmonella*. El tiempo en aparecer los síntomas después de contraer la bacteria es entre 8 y 48 horas. Los síntomas abarcan: cólicos, diarrea, escalofrío, fiebre, dolor muscular, náuseas y vómito. (9)

Intoxicación estafilocócica.

Es una intoxicación producida por enterotoxinas del *Staphylococcus aureus*, tras la ingestión, el periodo de incubación por lo general oscila entre 4 y 10 horas. Los signos clínicos incluyen síntomas similares a los de la gripe, entre ellos fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, náuseas, vómitos y diarrea. Generalmente las toxinas no son transmitidas de persona a persona ya que la enterotoxina estafilocócica no es dérmicamente activa, por lo general se transmiten por consumo de alimentos infectados con esta bacteria. (10)

Diarreas causadas por E. coli. Existen diversas cepas, las que difieren en sus características clínicas, epidemiológicas y patogénicas, aunque se semejan en que los alimentos contaminados intervienen en la transmisión. Produce un cuadro de diarreas líquidas acuosas, dolor abdominal, vómitos y a veces febrícula, puede llegar a la deshidratación y hemorragia interna. Se clasifican en: *E. coli enterotoxigénica*, *E. coli enteroinvasiva*, *E. coli enterohemorrágica*, *E. Coli enteropatógena*, *E. coli enteroadherente* y *E. coli enteroagregativa*. (5)

2.2.Marco referencial.

2.2.1. Producción de leche en el Ecuador.

En el 2012 se registraron un promedio de 5,6 millones de litros de leche diarios. En la región sierra la producción de leche a nivel nacional llega al 76,7% del total, siendo las provincias más representativas Pichincha con 14,3%; Azuay 9,99% y Cotopaxi 9,40% (11)

2.2.2. Producción lechera en la provincia de Manabí.

En la provincia de Manabí la producción de leche hasta el último censo realizado por el INEC en el 2012 fue de 521.845 litros diarios, entre los cantones mas productores de leche tenemos los cantones Chone, El Carmen, Flavio Alfaro, Roca fuerte. (12)

2.2.3. Producción lechera y quesera en el cantón Flavio Alfaro.

Según la encuesta realizada por el periódico “el diario” el 29 de febrero del 2016 en el cantón Flavio Alfaro se producen aproximadamente unos 25.000 litros de leche diarios, en lo cual un 80% (20.000 L.) es destinado a la producción de queso y el 20% restante al consumo directo. (13)

2.2.4. Instalaciones para la producción de queso fresco.

El local debe ser lo suficientemente grande para albergar las siguientes áreas: recepción de la leche, pasteurización, coagulación, moldeado, empaque, cámara de frío, bodega, laboratorio, oficina, servicios sanitarios y vestidor. La construcción debe ser en bloc y las paredes deben estar cubiertas de azulejo hasta una altura de 2 metros. (14)

Los pisos deben ser de concreto recubiertos de losetas o resina plástica, con desnivel para el desagüe. Los techos de estructura metálica, con zinc y cielorraso. Las puertas de metal o vidrio y ventanales de vidrio. (14)

Las puertas y ventanas deben cubrirse con cedazo para impedir la entrada de insectos. La planta debe tener un sistema para el tratamiento de los residuos líquidos y sólidos. (14)

2.2.4.1. Diagrama de flujo del queso fresco pasteurizado.

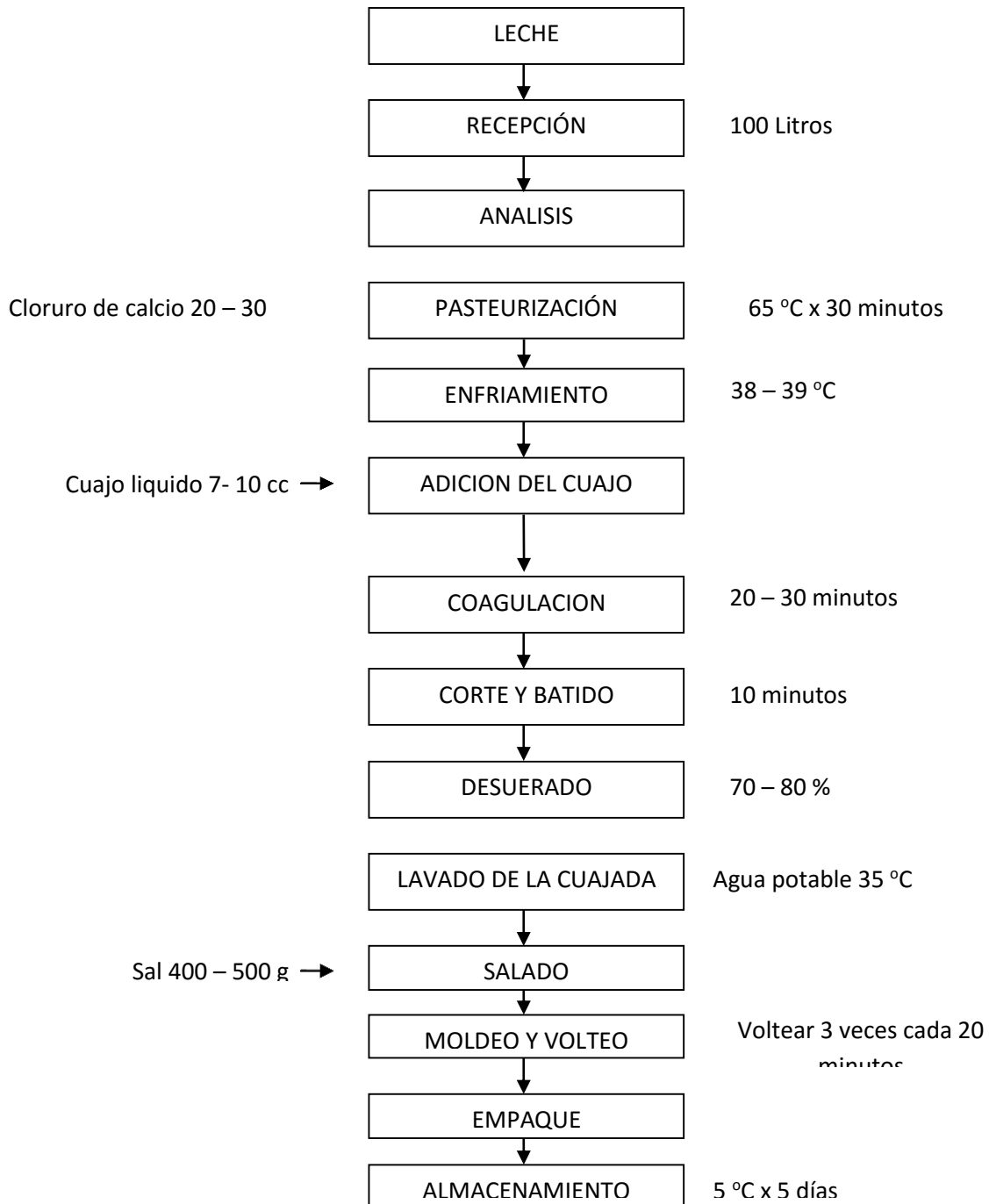


Figura 1: Diagrama de bloques mostrando corrientes de entrada y salida de proceso de elaboración de queso fresco pasteurizado según FAO (14)

2.2.5. Descripción del proceso de queso fresco.

Recepción: La leche de buena calidad se pesa para conocer la cantidad que entrará a proceso. La leche debe filtrarse a través de una tela fina, para eliminar cuerpos extraños.

Análisis: Deben hacerse pruebas de acidez, antibióticos, porcentaje de grasa y análisis organoléptico (sabor, olor, color). La acidez de la leche debe estar entre 16 y 18 °D (grados Dornic), lo cual expresa el nivel de ácido láctico de la leche. (14) (15)

Pasteurización: Consiste en calentar la leche a una temperatura de 65°C por 30 minutos para eliminar los microorganismos patógenos y mantener las propiedades nutricionales de la leche, para luego producir un queso de buena calidad. Aquí debe agregarse el cloruro de calcio para reforzar el contenido de calcio en la leche en una proporción del 0.02-0.03% en relación a la leche que entró a proceso. (14) (16)

Enfriamiento: La leche pasteurizada se enfría a una temperatura de 37-39°C, pasando agua fría en la chaqueta o con sacos con hielo. (14)

Adición del cuajo: Se agrega entre 7 y 10 cm³ de cuajo líquido por cada 100 litros de leche o bien 2 pastillas para 100 L (siga las instrucciones del fabricante). Se agita la leche durante un minuto para disolver el cuajo y luego se deja en reposo para que se produzca el cuajado, lo cual toma de 20 a 30 minutos a una temperatura de 38-39 °C. (14) (17)

Corte: La masa cuajada se corta, con una lira o con cuchillos, en cuadros pequeños para dejar salir la mayor cantidad de suero posible. Para mejorar la salida del suero debe batirse la cuajada. Esta operación de cortar y batir debe durar 10 minutos y al finalizar este tiempo se deja reposar la masa durante 5 minutos. La acidez en este punto debe estar entre 11 y 12°Dornic. (14) (17)

Desuerado: Consiste en separar el suero dejándolo escurrir a través de un colador puesto en el desagüe del tanque o marmita donde se realizó el cuajado. Se debe separar entre el 70 y el 80%

del suero. El suero se recoge en un recipiente y por lo general se destina para alimentación de cerdos. (14) (16)

Lavado de la cuajada: La cuajada se lava para eliminar residuos de suero y bloquear el desarrollo de microorganismos dañinos al queso. Se puede asumir que por cada 100 L de leche que entra al proceso, hay que sacar 35 L de suero y reemplazarlo con 30 L de agua tibia (35°C), que se escurren de una vez. (14)

Salado: Se adicionan de 400 a 500g de sal fina por cada 100 litros de leche y se revuelve bien con una paleta. Haga pruebas para encontrar el nivel de sal que prefieren los compradores. (14) (17)

Los moldes: que pueden ser de acero inoxidable o de plástico PVC, cuadrados o redondos, se cubren con un lienzo y se llenan con la cuajada. En este momento, se debe hacer una pequeña presión al queso para compactarlo mejor. Este queso no se prensa, solamente se voltean los moldes tres veces a intervalos de 15 minutos. Seguidamente, se deja reposar por 3 horas y luego se sacan los moldes y se guarda el queso en refrigeración. (14)

Pesado: Se hace para llevar registros de rendimientos, es decir los kilogramos obtenidas por litro de leche que entraron al proceso y preparar las unidades para la venta. (14)

Empaque: El empaque, se hace con material que no permita el paso de humedad. Generalmente se usa un empaque plástico. (14)

Almacenado: Se debe almacenar en refrigeración, para impedir el crecimiento de microorganismos y tener siempre queso fresco. El almacenamiento no debe ser mayor de 5-7 días. (14)

2.2.6. Características de la leche destinada a la elaboración de queso.

2.2.6.1. Requisitos físico-químicos.

Tabla 2. Requisito físico-químico de la leche cruda.

REQUISITO	UNIDAD	MIN.	MAX.	METODO DE ENSAYO
Densidad relativa:				
a 15 oC	-	1,029	1,033	NTE INEN 11
a 20 oC		1,028	1,032	
Materia grasa	% (fracción de masa) ⁴	3,0	-	NTE INEN 12
Acides titulable como ácido láctico	% (fracción de masa)	0,13	0,17	NTE INEN 13
Sólidos totales	% (fracción de masa)	11,2	-	NTE INEN 14
Sólidos no grasos	% (fracción de masa)	8,2	-	*
Ceniza	% (fracción de masa)	0,65	-	NTE IENE 14
Punto de congelación (punto crioscópico)**	oC oH	-0,536 -0,555	-0,512 -0,530	NTE INEN 15
Proteína	% (fracción de masa)	2,9	-	NTE INEN 16
Ensayo de reductasa (azul de metileno)***	H	3	-	NTE INEN 018
Reacción de estabilidad proteica (reacción de alcohol)	Para la leche destinada a pasteurización: No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol neutro de 68% en peso o 75% en volumen; y para la leche destinada a ultrapasteurización: No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol neutro de 71% en peso o 78% en volumen.			NTE IEN 1500
Presencia de conservantes	-	Negativo		NTE IEN 1500
Presencia de neutralizantes	-	Negativo		NTE IEN 1500
Presencia de adulterantes	-	Negativo		NTE IEN 1500
Grasa vegetal	-	Negativo		NTE IEN 1500
Suero de leche	-	Negativo		NTE IEN 1500
Prueba de Brucelosis	-	Negativo		Prueba de anillo PAL (Ring Test)
Residuos de medicamentos veterinarios ⁵	Ug/l	****	MRL, establecidos en el CODEX Alimentarius CAC/MRL 2	Los establecidos en el compendio de métodos de análisis identificados como idóneos para respaldar los LMR del codex ⁶

* Diferencia entre contenidos de sólidos totales y contenido de grasa.

** oC = oH f, donde f= 0,9656.

*** Aplicable a la leche cruda antes de ser sometida a enfriamiento.

1) Conservantes: formaldehído, peróxido de hidrógeno, cloro, hipocloritos, cloraminas, Lactoperoxidosa adicionada y dióxido de cloro.

2) Neutralizantes: orina, carbonatos, hidróxido de sodio, jabones.

3) Adulterantes: harinas y almidones, soluciones azucaradas o soluciones salinas, colorantes, leche en polvo, suero de leche, grasa vegetal.

4) Fracción de masa de B, Ws: Esta cantidad se expresa frecuente mente en por ciento, %, la notación %(m/m) no deberá usarse.

5) Se refiere a aquellos medicamentos veterinarios aprobados para uso en ganado de producción lechera.

6) Establecidos por el comité del codex sobre residuos de medicamentos veterinarios en alimentos.

Fuente: Instituto Ecuatoriano de Normalización NTE INEN 9

2.2.7. Requisitos microbiológicos.

La leche cruda debe cumplir con los requisitos microbiológicos presentados en la tabla 3

Tabla 3. Requisitos microbiológicos de la leche cruda tomada en hato.

Requisito	Límite máximo	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aeróbios mesófilos REP, UFC/cm ³	1,5 x 10 ⁶	NTE INEN 1529:-5
Recuento de células somáticas/ cm ³	7,0 x 10 ⁵	AOAC – 978.26

Fuente: Instituto Ecuatoriano de Normalización NTE INEN 9.

2.2.8. Valor nutricional del queso fresco.

- Calorías del queso fresco: 175 calorías.
- Proteínas: 16 g.
- Hidratos de carbono: 5 g.
- Grasas: 12 g.
- Vitaminas: ácido fólico (14,3 mcg.), B2 (0,18 mg.), B3 (1,2 mg.) B6 (0,09 mg.)
- Minerales: sodio (1.200 mg.) calcio (185 mg.), selenio (15 mcg.) fósforo (600 mg.).

Es necesario tener en cuenta que esta información nutricional del queso fresco dependerá de manera directa del tipo de queso que se vaya a consumir. Por tanto, son unos valores que pueden tomarse como ejemplo simplemente orientativo. (18)

2.2.9. Principales patógenos encontrados en los quesos frescos.

2.2.9.1. Echerichia coli.

Las bacterias de la especie E. coli pertenecen a la familia Enterobacteria ceae. Son bacilos cortos Gram negativos, quimio heterótrofos, catalasa positiva, oxidasa negativa, anaerobios facultativos. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar. (19)

Está presente en números elevados en las heces de animales y humanos, y es importante como indicador de la contaminación fecal en alimentos. Se caracteriza porque produce grandes cantidades de gas que causan la hinchazón de los quesos. Estas especies son habitantes normales del tracto intestinal del humano y de los animales, aunque también se encuentran en el suelo agua. (20)

Periodo de incubación: El período de incubación varía con la cepa, pero, como término medio, los síntomas suelen aparecer entre 8 y 72 horas. (19)

Temperatura: Algunas cepas de *E. coli* patógeno son capaces de crecer a temperaturas tan bajas como 7 °C y tan altas como 46 °C, siendo la escala de crecimiento óptimo 35 – 40 °C. Sin embargo, *E. coli* O157:H7 tiene un intervalo de crecimiento ligeramente más limitado, con una temperatura mínima de crecimiento de 8 °C, una máxima de aproximadamente 44 – 45 °C y una óptima de 37 °C. Distintos estudios de inactivación térmica han revelado que *E. coli* O157:H7 es más sensible al calor que las cepas típicas de *Salmonella* spp. Por esta razón, los tratamientos térmicos que son suficientes para destruir *Salmonella* también deberían provocar la muerte de *E. coli* O157:H7. (19)

2.2.9.2. Staphylococcus aureus.

Staphylococcus es un género de bacteria anaerobias Gram-positivas productoras de enterotoxinas termoestables ampliamente distribuida en el medio ambiente y presente en las mucosas de los animales y personas, transmitiéndose al ser humano a través de alimentos contaminados generándole una toxiinfección alimentaria. (21)

También puede encontrarse en el aire, agua, residuos, maquinaria y superficies de la industria alimentaria, pero su principal reservorio son los animales y humanos encontrándose en la piel, cabello, fosas nasales y garganta. (21)

Es muy resistente a las condiciones ambientales normales. Es capaz de sobrevivir hasta tres meses en un cultivo a temperatura ambiente. Muere expuesto a temperaturas mayores de 60 °C por una hora. En cuanto a los agentes químicos, es sensible a la mayoría de los desinfectantes y antisépticos, que lo matan en pocos minutos. (22)

2.2.9.3. Salmonella ssp.

El género *Salmonella* se ubica dentro del Orden Enterobacteriales y la Familia Enterobacteriaceae. Sus miembros son bacilos Gram negativos, generalmente móviles por flagelos peritricos (excepto *S. Gallinarum*), anaerobios facultativos no encapsulados y no esporulados. La diferenciación entre las especies y subespecies se realiza tomando en cuenta diferentes propiedades bioquímicas. (23)

La mayoría de los serotipos de *Salmonella* crecen en un rango de temperatura que va desde 5°C a 47°C, con una temperatura óptima de 35°C-37°C, algunas pueden llegar a crecer a 2°C o 4°C y hasta 54°C. El pH de crecimiento oscila entre 4-9 con un óptimo entre 6,5 y 7,5 (24)

2.2.9.4. Mohos y levaduras.

Las levaduras como los mohos son un tipo de hongos de la clase eucariotas, son organismos que poseen un núcleo celular y organelas que se encuentran rodeadas por una membrana. En ambos casos se trata de organismos oportunistas, los cuales actúan como parásitos en fuentes de materia orgánica, es decir se pueden reproducir en los alimentos, sin embargo, estas dos formas de vida son distintas en su estructura así como en su crecimiento y sus modos de reproducción. (25)

2.2.9.5. Levaduras.

Las levaduras en los quesos, principal mente en los maduros, se les ha atribuido propiedades beneficiosas sobre el flavor, la textura, algunas levaduras pueden producir alteración en los quesos mediante la generación olores afrutados, a levadura, pero en otras ocasiones a rancio, con formación de gas, colonias visibles y formación de limosidad no deseados. El crecimiento de levaduras en queso se ve positivamente influenciado por la presencia de lactosa residual no fermentada por las BAL. (26)

2.2.9.6. Mohos.

El crecimiento de mohos ocurre en la superficie de los quesos y salvo los quesos en los que se utilizan mohos en superficie y en la masa, se consideran alterantes, produciendo defectos en la

aparición como manchas pigmentadas y colonias visibles, además pueden generar olores atípicos, amoniacales, afrutados o a moho. (26)

2.3.Marco legal.

2.3.1. Norma codex para el queso (Codex Standard 283-1978).

2.3.1.1. Ámbito de aplicación.

La presente Norma se aplica a todos los productos destinados al consumo directo o a ulterior elaboración que se ajustan a la definición de queso que figura en la sección 2.3.1.2. (27)

2.3.1.2. Descripción.

Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante: (27)

- a) coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada/descremada, leche parcialmente desnatada/descremada, nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantequilla/manteca, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los materiales lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso. (27)

- b) Técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado (a). (27)

- Se entiende por queso sin madurar el queso que está listo para el consumo poco después de su fabricación. (27)

2.3.1.3. Higiene.

Se recomienda que los productos abarcados por las disposiciones de esta norma se preparen y manipulen de conformidad con las secciones pertinentes del Principios Generales de Higiene de los Alimentos (CAC/RCP 1-1969), el Código de Prácticas de Higiene para la Leche y los Productos Lácteos (CAC/RCP 57-2004) y otros textos pertinentes del Codex, como los Códigos de Prácticas de Higiene y los Códigos de Prácticas. Los productos deberán cumplir cualesquiera criterios microbiológicos establecidos de conformidad con los Principios y Directrices para el Establecimiento y la Aplicación de Criterios Microbiológicos en Relación a los Alimentos (CAC/GL 21-1997). (27)

2.3.2. Instituto ecuatoriano de la normalización (INEN).

2.3.2.1. NTE 1528 (2012) Norma general para quesos frescos no maduros.

Requisitos.

Para la elaboración de los quesos frescos no madurados, se pueden emplear las siguientes materias primas e ingredientes autorizados, los cuales deben cumplir con las demás normas relacionadas o en su ausencia. (6)

Leche y/o productos obtenidos de la leche.

Ingredientes tales como:

- a) Cultivos de fermentos de bacterias inocuas productoras de ácido láctico y/o aromas y cultivos de otros microorganismos inocuos.
- b) Cuajo u otras enzimas coagulantes inocuas e idóneas

Aditivos. Se pueden utilizar los aditivos permitidos y en las cantidades especificadas en la NTE INEN 2074 y además:

- a) **Gelatina y almidones modificados** (estas sustancias pueden utilizarse con los mismos fines que los estabilizadores, a condición de que se añadan únicamente en las cantidades funcionalmente necesarias)(6).
- b) **Harinas y almidones de arroz, maíz y papa** (estas sustancias pueden utilizarse con los mismos fines que los antiaglutinantes para el tratamiento de la superficie de productos cortados, rebanados y desmenuzados únicamente, a condición de que se añadan únicamente en las cantidades funcionalmente necesarias)(6).

Requisitos microbiológicos.

Al análisis microbiológico correspondiente, los quesos frescos no madurados deben dar ausencia de microorganismos patógenos, de sus metabolitos y toxinas.

Los quesos frescos no madurados, ensayados de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la tabla 4 (6).

Tabla 4. Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados.

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
<i>Enterobacteriaceas</i> , UFC/g	5	2x10 ²	10 ³	1	NTE INEN 1529-13
<i>Escherichia coli</i> , UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991. 14
<i>Staphylococcus Aureus</i> UFC/g	5	10	10 ²	1	NTE INEN 1529- 14
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	Ausencia	-		ISO 11290- 1
<i>Salmonella</i> en 25 g	5	Ausencia	-	0	NTE INEN 1529- 15

n: Número de muestras a examinar.

m: Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M: Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.

c: Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.

Fuente: Instituto Ecuatoriano de Normalización NTE INEN 1528 (6)

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.Localización.

Esta investigación se realizara en dos localidades la toma de muestras en la industria se realizara en el cantón Flavio Alfaro perteneciente a la provincia de Manabí con una extensión de 1343km² y una población de 25.004 habitantes según el último censo de población y vivienda del 2011. Y la otra localidad será en el laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en la avenida Quito kilometro 1^{1/2} vía Santo Domingo de los Sachilas.

3.2.Tipo de investigación.

En la presente investigación se empleara un análisis estadístico ya que se investigara la calidad microbiológica de una exploración de datos obtenidos mediante muestreo, los dichos muestreos se van a obtener durante todo el proceso, como son: muestras de materiales y equipos, ingredientes, materia prima, recursos humanos, agua utilizada y producto final.

3.3.Método de investigación.

El método de investigación será hipotético deductivo, ya que se utilizan hipótesis y luego de los resultados obtenidos se negara o aceptaran las mismas según las normas INEN establecidas para estos casos, y posteriormente dedujere conclusiones.

3.4.Recopilación de información.

Se elaborara un cuestionario debidamente estructurado con preguntas cerradas de opción múltiple para obtener información sobre el procesamiento, dirigidas directamente al personal de trabajo y encargado de la planta procesadora de queso fresco “CE-CE-PE”.

3.5. Instrumentos de la investigación.

- Equipos de oficina (Computadora, papel bond, impresora, pen drive.)
- Carro.

3.6. Recursos humanos y materiales.

3.6.1. Recursos humanos.

- Estudiante investigador
- Asesores de estudio

3.6.2. Recursos de laboratorio.

- Refrigeradora
- Incubadora
- Balanzas
- Erlen Meyer
- Cajas Petri
- Bolsas plásticas
- Mechero de bunsen

3.6.3. Recursos Biológicos.

- Muestras de queso

3.6.4. Recursos Químicos.

- Medios de cultivo
- Reactivos

3.7.Muestreo.

En un mismo día, al azar se tomaron las muestras representativas en cada una de las etapas del proceso. Las diversas muestras consideradas y analizadas fueron:

- a) Leche cruda, leche pasteurizada, cuajada y queso al final del proceso en la planta (fase de despacho).
- b) Agua de servicio tomada en diversos puntos dentro del área de procesos.
- c) Materiales utilizados al inicio del proceso y al final después de la limpieza (tinajas, mesa de trabajo, moldes, lira, palas, lienzo).
- d) Manos de operarios. Esta toma de muestras se realizó 2 veces en las diferentes etapas del proceso durante todo el procesamiento.

La identificación, preparación y transporte de la muestra se realizó según la Norma NTE INEN 1 529-2:99 (28). Los análisis microbiológicos se realizaron en el laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ). Todos los análisis microbiológicos de las muestras y/o sus diluciones sucesivas sembradas en placas con los diferentes medios se realizaron por duplicado y en el caso de número más probable (NMP) se realizaron por triplicado.

3.8.Evaluación microbiológica.

La leche cruda, leche pasteurizada, cuajada y el queso se determinó el NMP de *coliformes fecales* y *E. coli* y por duplicado se hicieron *mohos* y *levaduras*, *salmonella* y *Staphylococcus aureus*, siguiendo las respectivas normas INEN para cada uno de estos análisis (29) (30) (31) (32).

Para determinar la calidad sanitaria del agua se determinó usando la técnica del NMP de *coliformes fecales*, *E. coli*, *mohos*, *levaduras*, *salmonella* y *Staphylococcus aureus*, según la norma NTE INEN 2 169, (33)

Antes y después de higienizar los materiales y equipos, se determino los recuentos de microorganismos *coliformes fecales*, *E. coli*, *mohos*, *levaduras*, *salmonella* y *Staphylococcus aureos*, mediante la técnica del hisopado según la norma NTE INEN 1 529-2:99 (28)

Para evaluar la calidad sanitaria de las manos de los operarios durante el proceso de elaboración del queso se utilizo la técnica del hisopado (28). Posteriormente se procedio hacer los respectivos análisis microbiológicos, *coliformes fecales*, *E. coli*, *mohos*, *levaduras*, *salmonella* y *Staphylococcus aureos*.

3.8.1. Determinación de Salmonella spp. (NTE INEN 1529-15:2009).

Pre enriquecimiento.

Se tomo 25 gr de queso, o en caso de muestras liquidas como: leche cruda, leche pasteurizada, agua, cuajada y disoluciones obtenidas de la técnica del hisopado se tomo 25 mL en un matraz de 1000 mL de capacidad, conteniendo 425 mL de agua peptonada, Se incubo a 37° C durante 24 h. Luego de ese tiempo se extrajo 1 mL de esa mezcla y se coloco en un tubo de ensayo con 9 mL de agua peptonada tamponada bufferada, se incubo a 37° C durante 24 a 48 horas con la finalidad de recuperar las células de Salmonella, que pudieran estar dañadas, a una condición fisiológica estable. (29)

Enriquecimiento.

Luego del tiempo de pre enriquecimiento inmediatamente se extrajo con pipeta 1 mL de cada muestra y se sembro en un Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, conteniendo 100 mL de caldo tetratoniato incubándose a 42°C por 24 horas y otro con 100 mL de caldo Rappaport Vassiliadis y se incubo a 42°C por 24 horas. Se extrajo una asada de ambos medios y se inoculo por separado, por estrías, en tubos de ensayo con agar nutritivo en picos de flauta a 42°C por 24h. (29)

Inoculación en Agares selectivos.

Se saco una asada del medio anterior y se inoculo por estrías en placas petri contenidas con agar XLD a 37 °C por 24h. En caso de haber colonias sospechosas se procedio a sembrar en agar TSI y LIA. (29)

3.8.2. Determinación de coliformes fecales y E.coli (NTE INEN 1529-8).

Se uso 1g. de queso o en el caso de muestras liquidas o disoluciones 1mL, se mezclo con 9 mL de agua peptonada tamponada buferada y se llevo al vortex luego de procesada se extrajo 1mL de la muestra homogenizada para la respectivas diluciones. (31)

Una vez realizada las diluciones con una pipeta estéril, se transfirio 1 mL de las diluciones a cada uno de los tubos que contengan 10 mL de 39 caldo BGBL (Brilliant Green Bilis Lactosa) cada uno con su respectiva campana Durham para la observación de reacciones positivas a la producción de gas, se incubo a una temperatura 37°C por 48 horas. (31)

Transcurrida las 48 horas se observo la producción de gas en cada dilución para como presunta positiva todos los tubos que presenten crecimiento con producción suficiente de gas. Se agito cada uno de los tubos presuntivos y con una asa de inoculación a partir de cada de uno de ellos se sembro por estrías en placas individuales secas de Agar EMB. Se invertira las cajas y posteriormente se las incubo a 37 °C por 24 horas. Las colonias fueron sembradas mediante estrías y picaduras en agar TSI y medio SIM, se incubo a 37 °C por 48 horas. (31)

Las que den positivo para *coliformes fecales*, se sembro en agar nutritivo a 37 °C por 48 horas al término del cual se le añadira a cada tubo 4 gotas del reactivo de Kovacs y se observo si hay o no reacción (anillo de indol) y asi confirmando la presencia o ausencia de *Escherichia coli* como referente de los coliformes fecales. (31)

3.8.3. Detección de recuento *Staphylococcus aureus*. (NTE INEN 1529-14:98).

De una muestra se extrajo 25g de queso o en el caso de muestras líquidas o disoluciones 25mL, se mezcló con 225 mL de agua peptonada, se llevó al vortex, luego de procesada la muestra se extrajo 1 mL de la mezcla homogenizada. Se preparó diluciones. (32)cc77

Se pipeteó por duplicado en cada caja Petri contenida con 20 mL de agar Bair Parker, 0.25cm³ de cada dilución. (32)

Se diseminó con la varilla en L, uniformemente, sobre la superficie del agar, hasta que valla absorbido por el medio. Se utilizó una varilla por dilución. Se invertirán las placas y se incubó a 42 °C durante 48 h. Luego de visualizar las placas, se identificaron colonias diferentes o iguales a las de *S. aureus* presuntivos, dando como resultado positivo o negativo a dicho estudio. (32)

3.8.4. Detección de recuento de moho y levadura (NTE INEN 1529-10:98).

Utilizando una pipeta estéril, se pipeteó, por duplicado, alícuota de 1cm³ de cada una de las diluciones, iniciando por la dilución de menor concentración. (30)

Inmediatamente, se vertió en cada una de las placas contenidas de 20 cm³ de agar sal- levadura de Davis (SLD) fundido y templado a 45 ± 2°C. Luego, delicadamente se mezcló el inóculo de siembra con el medio de cultivo, imprimiendo en la placa movimientos de vaivén, 5 veces en una dirección y luego hacerla girar cinco veces en el sentido de las manijas del reloj. Se invertirá las placas y se incubó entre 22°C y 25°C, por cinco días. (30)

Se seleccionó a los cinco días, las placas que presenten entre 10 y 150 colonias y se contó sin el auxilio de lupas. La mayoría de las colonias de levaduras son húmedas y algo mucosas, también pueden ser harinosas, blanquecinas y algunas cremosas y rosadas, las colonias de mohos tienen un aspecto algodonoso característico. Se contó las colonias de mohos y levaduras por separado y luego se procedió a hacer el respectivo cálculo. (30)

3.9. Análisis estadístico.

Los resultados microbiológicos se expresaron como logaritmos o ufc/g de los recuentos microbianos en las cuatro etapas consideradas del proceso. Se aplicó un análisis de diferencia de hipótesis entre los datos arrojados por las muestras y los datos referenciales (poblacionales) según lo establecidos por la Normas NTE INEN 1528 (6). Para cada una de las variables en leche cruda y queso al final del proceso se aplicó el análisis estadístico de prueba t de Student debido al desconocimiento de la varianza poblacional ya que el tamaño muestral < 30 .

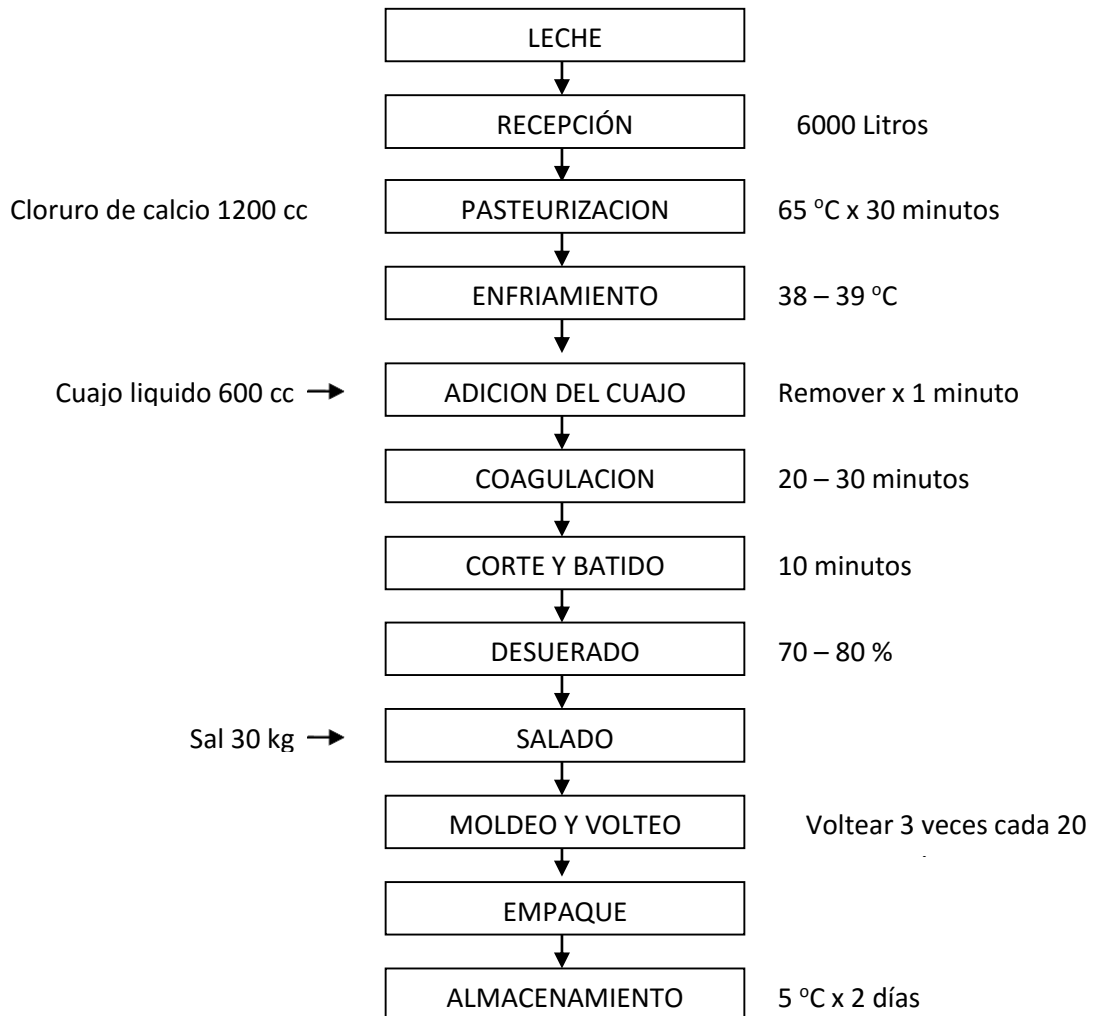
CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUCIONES

4.1.Resultados y discusión.

4.1.1. Diagnóstico de la planta procesadora “CE-CE-PE”

4.1.1.1. Flujograma de proceso de elaboración de queso fresco de la planta procesadora “CE-CE-PE”



Fuente: Autor, 2016

Recepción: la leche que llega a la planta en tanques de acero inoxidable, es pesada para saber la cantidad que ingresara y filtrada para evitar ingreso de cuerpos extraños, posterior mente se almacena en tanques a temperatura ambiente.

Pasteurización: se calienta la leche a 65°C por 30 minutos para eliminar los microorganismos, en este proceso se le agrega el cloruro de calcio para reforzar el cloruro de calcio.

Adición del cuajo: después del enfriamiento a 37 °C se hace la agregación del cuajo líquido 600 cc para los 6000 L de leche. Se agita para homogenizar el cuajo y se deja reposar para que produzca la cuajada este proceso dura unos 25 minutos.

Corte: La masa cuajada se corta, con una lira para dejar salir la mayor cantidad de suero posible. Para extraer la mayor cantidad del suero se bate durante 10 minutos con una pala.

Desuerado: se pone la cuajada sobre la mesa envuelta en una maya para escurrir el suero en este punto se bate la cuajada con las manos de los operarios y se deja escurrir unos 10 minutos.

Salado: se adiciona sal fina entre 400 y 500g por cada 100 L de leche procesado y se revuelve bien la cuajada con una paleta.

Moldeado: se pone la cuajada en los diferentes moldes y se deja reposar unos 5 minutos antes de ser volteado, este proceso se repite 3 veces.

Almacenado: Se almacena en refrigeración de 5°C para impedir el crecimiento de microorganismos, el queso queda almacenado unos 2 días antes de ser despachado.

4.1.1.2. Edificación e instalaciones

En el área de recepción y procesos, las ventanas ubicadas en la parte más elevada, así como el aire acondicionado, no reciben una limpieza diaria, permitiendo la acumulación de polvo. En la vía de desagüe de la planta no se observaron problemas; sin embargo, cabe destacar que no reflejan manejos de limpieza continuo, para impedir cualquier complicación que pudiera presentarse durante el procesamiento del alimento. Las tuberías, en el interior de la planta se observan en buen estado, pero no son lavadas continuamente y almacenan suciedad. Con

respecto a la iluminación, los bombillos en el área de procesos están protegidos, lo cual, en caso de ruptura, pudieran evitar contaminación del producto. Los servicios sanitarios se mantienen limpios y abastecidos de los materiales y detergentes para la higiene personal. Los equipos como el pasteurizador, acondicionadores de aire en el cuarto frío, caldero generador de agua caliente y vapor, entre otros se observan en buenas condiciones.

4.1.1.3. Higiene de equipos, utensilios, pisos y personal.

La higiene del pasteurizador y las tuberías por donde pasa la leche, se realiza antes de comenzar la jornada y al finalizar la misma (se le coloca cloro y detergente en polvo y agua a 90°C). Los equipos y utensilios del área de producción (tina, lira, mesa, moldes, pala, lienzo) se lavan diariamente al terminar el proceso de producción usando abundante agua con cloro y detergente en polvo. Los pisos son lavados con agua, detergente, cloro y frotados con escoba. Cabe destacar que en la planta no hay afiches que tengan lineamientos generales de limpieza y desinfección.

Dentro de las prácticas higiénicas de los operarios está lavarse las manos con agua y soluciones detergentes antes de empezar el proceso de producción. Aunque la apariencia de los uniformes de los operarios era aceptable en cuanto al uso de uniformes, se encontraron algunas fallas, tales como no lavarse las manos después de manipular cualquier material u objeto que pudiese representar riesgo de contaminación para el alimento, entre otros. Por otra parte, se observó que los operarios entran y salen de la planta sin quitarse el uniforme. Todos estos factores hacen de los operarios una fuente de contaminación en la producción del queso.

4.1.1.4. Productos tóxicos

Los productos e utensilios destinados a la limpieza y desinfección de la planta se encuentran ubicados en un departamento destinado para tal fin.

4.1.1.5. Control del ambiente y de plagas

En la planta no hay políticas reguladoras de depuración del ambiente. Además, aunque existen ventanas que actúan como barrera, estas suelen permanecer abiertas, durante las horas de

trabajo, por lo que en el área de producción se observó la presencia de algunos insectos en el aire, componente que pudiera contaminar el alimento. Con respecto a los otros tipos de plagas existen el uso de trampas, papel insecticidas, etc.

4.1.1.6. Almacenamiento y transporte

El queso se almacena en cuartos fríos a 4 °C antes de su venta. El transporte se realiza en gavetas sin ningún tratamiento de frío.

4.1.2. Evaluación Microbiológica de la Elaboración del Queso fresco.

4.1.2.1. Recuento de moho y levadura

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos de los recuentos para mohos y levaduras. El recuento de mohos solo en la leche cruda excede el valor $M= 5 \times 10^4$ ufc/g exigido por la Norma NTE INEN 1529 para este queso, pero al ser sometida la leche a la pasteurización se pudo bajar el nivel de moho haciendo que este dentro de lo permisible por la norma INEN. El recuento de levadura fue alto en la mayoría de las muestra, está sobre el valor de $M= 5 \times 10^4$ ufc/g exigido por la Norma NTE INEN 1529 para este queso, aunque hasta ahora, se considera que las levaduras no producen ETA, pueden causar deterioro en el producto (34). La contaminación en toda la planta ser causada al ambiente debido al calor húmedo (24 °C) durante la producción en el área de procesos, ya que las levaduras presentan su mayor crecimiento a temperaturas entre 25 °C y 30 °C en un ambiente húmedo (34).

Tabla 5. Recuento de moho y levadura.

Muestras	Moho (Log. Ufc/g,cm²,mL)	Levadura (Log. Ufc/g,cm²,mL)
Leche cruda	1.0x10 ^{5*}	2.3x10 ^{6*}
Leche pasteurizada	4.5x10 ²	3.6x10 ⁴
Cuajada	1.8x10 ³	1.5x10 ^{6*}
Quesos	1.0x10 ⁴	3.1x10 ^{5*}
Agua	2.7x10 ³	1.9x10 ^{5*}
Tinas	4.5x10 ²	4.0x10 ^{5*}
Lira	1.8x10 ³	4.1x10 ⁴
Mesa	1.4x10 ³	5.0x10 ^{5*}
Moldes	4.5x10 ³	1.3x10 ^{6*}
Pala	4.5x10 ³	1.3x10 ^{5*}
Lienzo	3.6x10 ³	3.6x10 ⁴
Manos operario 1 inicio.	3.2.x10 ³	1.5x10 ^{5*}
Manos operario 1 final.	3.2x10 ³	7.7x10 ^{5*}
Manos operario 2 inicio.	1.8x10 ³	1.2x10 ^{6*}
Manos operario 2 final.	3.2x10 ³	1.6x10 ^{6*}

* valores de muestras que exceden el valor M= 5x10⁴ ufc/g exigido por la Norma NTE INEN 1529 para este tipo de queso.

Fuente: elaborado por el autor, 2016.

4.1.2.2. Recuento de Staphylococcus aureus.

En la tabla 2 se presentan los resultados de los recuentos de *S. aureus*. Los recuentos de *S. aureus* obtenidos en las muestras de leche cruda, cuajada y manos de los operadores se encuentran por encima del valor $M=10^2$ ufc/g establecido por la Norma NTE INEN 1528, la leche al ser sometida a pasteurización reduce la carga de dichos microorganismos, pero por la manipulación de la cuajada por parte de los operarios vemos una evidente contaminación, sin embargo, se observa que el queso analizado presentó un recuento $<1.0 \times 10^2$ ufc/g. lo cual está dentro de lo permisible por dicha norma, esto es posible ya que la sal añadida en los quesos actúa como inhibidora de microorganismos. En este sentido debe tenerse extremo cuidado con el control de *S. aureus*, ya que altos recuentos de este microorganismo producen enterotoxinas que causan intoxicaciones alimentarias (35).

Tabla 6. Recuento de Staphylococcus aureus.

Muestras	S. aureus (Log. Ufc/g,cm²,mL)
Leche cruda	5.2x10 ⁵ *
Leche pasteurizada	<1.0x10 ¹
Cuajada	2.5x10 ² *
Quesos	<1.0x10 ²
Agua	<1.0x10 ²
Tinas	<1.0x10 ²
Lira	<1.0x10 ²
Mesa	<1.0x10 ²
Moldes	<1.0x10 ²
Pala	<1.0x10 ²
Lienzo	<1.0x10 ²
Manos operario 1 inicio.	4.5x10 ² *
Manos operario 1 final.	3.5x10 ² *
Manos operario 2 inicio.	4.0x10 ² *
Manos operario 2 final.	4.5x10 ² *

* Valores de muestras que exceden el valor M= 10² ufc/g.
exigido por la Norma NTE INEN 1528 para este tipo de queso.

Fuente: elaborado por el autor, 2016.

4.1.2.3. Determinación del NMP de coliformes totales

En la Tabla 3, se presentan los resultados del NMP de CT. Los valores promedios del NMP/mL de CT en la leche cruda son elevados, debido posiblemente a las malas prácticas de manipulación en el ordeño del ganado vacuno en las fincas proveedoras de leche a la planta y/o a una Refrigeración inadecuada inmediatamente después que se ha obtenido la misma (36). Los valores promedios del log NMP/mL de CT hallados en la leche pasteurizada indican que se cumplen los requisitos establecidos por las Normas NTE INEN y que el proceso de pasteurización es eficiente. En la cuajada aumentaron los valores promedios del NMP/g de CT con respecto a la leche pasteurizada, lo cual se debió a que la cuajada tiene excesiva manipulación directa y el personal desconoce normas de higiene, también se empleo de una gran cantidad de utensilios sucios demostrando la deficiencia de buenas prácticas de fabricación.

Tabla 7. Determinación del NMP de coliformes totales.

Muestras	(NMP/g,cm²,mL)
Leche cruda	1100*
Leche pasteurizada	<10
Cuajada	480*
Quesos	76*
Agua	210*
Tinas	210*
Lira	150*
Mesa	150*
Moldes	624*
Pala	1100*
Lienzo	150*
Manos operario 1 inicio.	28*
Manos operario 1 final.	1100*
Manos operario 2 inicio.	210*
Manos operario 2 final.	1100*

* Valores de muestras que exceden el valor M= 10 exigido por la Norma NTE INEN 1528 para este tipo de queso.

Fuente: elaborado por el autor, 2016.

Los valores promedios del NMP/gr de CT en el queso evidencian una disminución numérica con respecto a los valores presentes en la cuajada, lo cual puede explicarse por la acción inhibitoria de la sal en el crecimiento de diversos microorganismos (37), la temperatura de refrigeración de conservación del queso y al control que ejerce sobre los microorganismos indeseables aun así no logra entrar dentro del valor M= 10 exigido por la Norma NTE INEN 1528 para este tipo de queso.

La contaminación de la cuajada refleja deficientes prácticas en la higiene del personal y desinfección de los equipos, tal como se puede observar en los recuentos de CT en los manipuladores y en los equipos. Los equipos involucrados en la preparación de alimentos, deben estar libres de bacterias coliformes, pero los valores obtenidos superan ampliamente este criterio establecido para los equipos antes y después de ser higienizados, corroborando las fallas en la desinfección. En la cuajada estos índices de contaminación, directa o indirectamente de origen CT, constituyen un peligro potencial de contaminación con patógenos entéricos.

4.1.2.4. Determinación E. coli y salmonella.

No hubo presencia de salmonella en el queso fresco como se muestra en la tabla 4, con lo cual se cumple con el requisito establecido por la Norma NTE INEN 1528 Para el queso fresco no maduro (ausencia de Salmonella sp en 25g de queso).

Se puede apreciar en la Tabla 4 que la carga microbiológica de E. coli en la leche cruda (70 ufc) está por mayor del valor máximo permisible por la norma NTE INEN 1528 para este tipo de queso, al ser sometida la leche a la pasteurización podemos apreciar una carga microbiológica de E. coli (<10) lo cual está dentro de lo permitido por la norma NTE INEN 1528, lo que nos indica que este tratamiento térmico es efectivo en la eliminación de este microorganismo, pero podemos ver en los valores de E. coli de la cuajada (40 ufc) el cual excede el valor máximo permisible por la norma NTE INEN 1528, esto se puede deber a la constante manipulación de la cuajada por parte del personal de trabajo, lo que nos indica una deficiencia en la higienización de las manos del personal.

Tabla 8. Determinación de E. coli y salmonella.

Muestras	E. coli (Log. Ufc/g,cm²,mL)	Salmonella (Log. Ufc/g,cm²,mL)
Leche cruda	73*	Ausencia
Leche pasteurizada	<10	Ausencia
Cuajada	40*	Ausencia
Quesos	<10	Ausencia
Agua	<10	Ausencia
Tinas	<10	Ausencia
Lira	<10	Ausencia
Mesa	<10	Ausencia
Moldes	<10	Ausencia
Pala	10	Ausencia
Lienzo	10	Ausencia
Manos operario 1 inicio.	60*	Ausencia
Manos operario 1 final.	70*	Ausencia
Manos operario 2 inicio.	65*	Ausencia
Manos operario 2 final.	70*	Ausencia

* valores de muestras que exceden el valor M= 10 exigido por la Norma NTE INEN 1529 para este tipo de queso.

Fuente: elaborado por el autor, 2016.

4.1.2.5. Análisis estadístico T Student.

En la tabla 9 se muestran los resultados del análisis estadístico T Student de las muestras leche cruda y Queso con un nivel de confianza del 1% y 5 % para cada uno de los análisis microbiológicos.

Como podemos observar en la tabla 5, los análisis microbiológicos para moho y levadura tuvimos una alta diferencia estadística con una probabilidad ≤ 0.01 , lo que indica que si hubo una reducción significativa de microorganismos, en cuanto a los análisis de *S. aureu* y *E. coli* tuvimos una diferencia estadística significativa con una probabilidad ≤ 0.05 , lo que revela que hubo una disminución de microorganismos, y para el análisis de coliformes totales vemos que no hubo diferencia significativa estadística esto muestra que no hubo una reducción de este microorganismo durante el procesamiento.

Tabla 9. Análisis estadístico T Student de las muestras leche cruda y queso.

Muestras	levadura		Moho		S. aureu		Coliformes T.		E. Coli	
	LC Ufc/mL	Q Ufc/g	LC Ufc/mL	Q Ufc/g	LC Ufc/mL	Q Ufc/g	LC NMP/m L	Q NMP/g	LC NMP/m L	Q NMP/g
1	2.3x10 ⁵	1.9x10 ⁴	1.0x10 ⁴	1.8x10 ²	5.2x10 ⁴	80	1.1x10 ²	150	70	10
2	2.1x10 ⁵	4.6x10 ⁴	1.2x10 ⁴	9.1x10 ²	5.1x10 ⁴	90	1.1x10 ²	28	60	8
3	2.2x10 ⁵	2.6x10 ⁴	1.1x10 ⁴	9.1x10 ²	4.5x10 ⁴	70	2.4x10 ²	150	80	5
4	2.3x10 ⁵	5.4x10 ⁴	1.0x10 ⁴	9.1x10 ²	3.5x10 ⁴	90	1.1x10 ²	28	85	13
5	2.4x10 ⁵	1.1x10 ⁴	1.2x10 ⁴	4.5x10 ²	3.8x10 ⁴	70	1.1x10 ²	28	70	10
Nivel de significancia										
5%	*		*		*		N.S.		*	
1%	*		*		N.S.		N.S.		N.S.	

LC= Muestras de leche cruda

Q = Muestras de queso.

Los valores de los análisis microbiológicos que tengan 2 asteriscos significa que hay diferencia estadística con una probabilidad ≤ 0.01 , los valores de los análisis microbiológicos que contengan 1 asterisco significa que hay diferencia estadística con una probabilidad ≤ 0.05 y los valores de los análisis que no contengan asterisco significa que no hay diferencia estadística significativa.

CAPÍTULO V

CONCLUSION Y RECOMENDACION

5.1. Conclusiones

- No se detectó la presencia de *salmonella* en las diferentes etapas de procesamiento del queso fresco, no obstante se detectó en varias etapas del procesamiento la presencia de *escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *coliformes totales*, *mohos* y *levaduras*, sin embargo no se evidenció la presencia de microorganismos en los quesos que estuvieran fuera de lo permisible por la norma NTE INEN 1528 para este tipo de queso, esto se debe a la utilización de sal que actúa como inhibidora de microorganismos, a excepción de los *coliformes totales* y *levaduras* que están fuera de lo permisible por la norma NTE INEN 1528. Por lo tanto se acepta la H_0 que dice: El queso producido en la planta procesadora CE-CE-PE no hay existencia de *salmonella* de acuerdo con las normas NTE INEN- 1528.
- La pasteurización demostró ser eficiente en la destrucción de microorganismos y la utilización de sal en los quesos destruyen la mayor parte de los microorganismos presentes en la cuajada, en el proceso de fabricación del queso existen deficiencias prácticas de manufactura así como en los procedimientos de higiene de los materiales y operarios, por lo tanto la Planta debe adoptar las medidas correctivas correspondientes a las deficiencias halladas.
- La carga microbiológica de *coliformes totales* y *levaduras* están fuera de lo permisible por la norma NTE INEN 1528, lo que evidencia una falta de práctica de higiene y salubridad sobre todo en los materiales y operarios que están en constante contacto directo con el alimento, sin embargo la carga microbiológica de *escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *salmonella* y *mohos* están dentro de lo permisible por la norma NTE INEN 1528, esto se debe gracias a la acción inhibidora de microorganismos de la sal usada en los quesos. Por lo tanto se acepta la H_0 que dice: en la planta procesadora CE-CE-PE no se puede diagnosticar presencia de *E. coli* en los quesos producidos que estén fuera de lo permisible de acuerdo a las normas NTE INEN-1528.

Recomendaciones

- Desarrollar y mantener prácticas higiénicas (POES, HACCP y BPM) con el fin de evitar la proliferación de microorganismos patógenos o de deterioro que pudieran afectar la calidad de los quesos.
- Realizar análisis físico-químicos a la leche en la fase de recepción para así evitar la compra de leche de mala calidad que pudiera tener con la calidad de los quesos.
- Estudiar el impacto e implementar buenas prácticas de ordeno y transporte de la leche cruda para así de esta manera cuidar la calidad y evitar la proliferación acelerada de microorganismos que pudieran afectar la calidad de los quesos.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía.

1. Alarcon R, Calvo J, Gonzales J, Ochoa O, Rivera J. Tecnico auxiliar de hosteleria de la Universidad de Granada. Primera edición ed. S.L M, editor. Sevilla: Mad S.L; 2005.
2. Gutierrez G. Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Nicaragua. Estudio de Caso. Nicaragua: FAO; 2005.
3. Barrios H. Evaluacion y mejoramiento de la calidad microbiologica de queso fresco a base de leche no pasteurizada, elaborado artesanalmente y comercializado en la facultad de Medicina de veterinaria y zootecnia de la universidad de San Carlos de Guatemala. 2006. Tesis.
4. Zamora R, Martinez H, Montañez J, Huerta U, Perez R. Estudio microbiologico de queso fresco adicionado con el probiotico Saccharomyces Boulardi. Biologica. 2012 Diciembre; 14(2).
5. Caballero A. Temas de higiene de los alimentos. Primera edicion ed. Cheping N, editor. La Habana: Ciencias Medicas; 2008.
6. Instituto Ecuatoriano de Normalizacion (INEN). Norma general paral quesos frescos no madurados. requisitos.. 2012. NTE INEN 1528.
7. Nava P, Cipriano G. Tecnologia de granos y semillas. Primera edicion ed. Batiz J, editor. Mexico: CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa; 2009.
8. Elika. Elika. [Online].; 2013 [cited 2016 agosto 17. Available from: <http://www.elika.eus/datos/articulos/Archivo1213/toxiinfecciones%20alimentarias.pdf>.
9. University of Meryland. Enterocolitis por salmonela. 2012. School of Medicine.
10. The Center for Food Security & Plublic Health. Intoxicacion Estafilococica. Intitute for International Cooperation in Animal Biologics. 2007 Agosto; I(1).

11. Instituto nacional de estadística y censos. Encuesta de superficie y producción agropecuaria continúa 2013. Informe ejecutivo. Quito: Dirección de comunicación social; 2012.
12. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Datos estadísticos agropecuarios. 2011. INEC.
13. El Diario. Comerciantes de leche la ven "Negra". El Diario. 2016 Febrero: p. 7.
14. FAO. sitio Web FAO. [Online].; 2014 [cited 2016 Abril 4. Available from: <http://www.fao.org/3/a-au170s.pdf>.
15. Moreno S. Elaboración de productos lácteos. 2001. Manual, Universidad Autónoma Chapingo..
16. Instituto nicaraguense de apoyo a la pequeña y mediana empresa. Proyecto de cooperación de seguimiento para el mejoramiento tecnológico de la producción láctea en las micro y pequeñas empresas de los departamentos de boaco, chontales y matagalpa. 2015. Manual.
17. Galvan M. Proceso básico de la leche y el queso. Revista digital universitaria. 2005 Septiembre; 6(9).
18. Perez C. sitio Web de Natursan. [Online].; 2015 [cited 2016 Abril 18. Available from: <http://www.natursan.net/informacion-nutricional-queso-fresco/>.
19. Agatangelo DS. Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos. 2007.
20. Carrasco G. Evaluación microbiológica del queso Cabaña elaborado en la planta de lácteos de Zamorano. 2002. Tesis de grado.
21. elika. sitio Web elika. [Online].; 2013 [cited 2016 Abril 22. Available from: http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento95/7.Staphylococcus.pdf.

22. Instituto de higiene Uruguay. sitio Web Higiene. [Online].; 2008 [cited 2016 Abril 23]. Available from: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>.
23. Aguilar F, Escolastica L. Caracterización Fenotípica y Genotípica de Estirpes de Salmonella Choleraesuis Aisladas de Ambientes Marinos. 2003. Tesis.
24. Gonzalez J, Pereira N, Soto Z, Hernández E, Villarreal J. Aislamiento microbiológico de Salmonella ssp y herramientas moleculares para su detección. Salud Uninorte. 2014 Enero; 30(1).
25. Norma GMP B2. sitio Web de Norma GMP B2. [Online].; 2014 [cited 2016 Abril 26]. Available from: <http://gmp-b2.blogspot.com/2014/04/diferencias-entre-mohos-y-levaduras.html>.
26. Socorro V. Caracterización Microbiológica de diversos tipos de Quesos elaborados en el valle de Tulancingo Hidalgo. 2006. Tesis.
27. Codex Standard 283-1978. Norma codex para el queso. 2013. Norma alimenticia Codex.
28. Instituto Ecuatoriano de Normalizacion (INEN). Control microbiologico de los alimentos toma, envio y preparacion de muestras para el analisis microbiologico. 1999. NTE INEN 1529-2:99.
29. Instituto Ecuatoriano de Normalizacion. Control microbiologico de los alimentos. Salmonella. Metodo de deteccion. 2009. NTE INEN 1529-15: 2009.
30. Instituto Ecuatoriano de Normalizacion. Control microbiologico de los alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuentos en placa por siembra en profundida. 1998. NTE INEN 1529-10.
31. Instituto Ecuatoriano de Normalizacion. Control microbiologico de los alimentos. Determinacion de coliformes fecales y E. coli. 1990. NTE INEN 1529-8.

32. Instituto Ecuatoriano de Normalizacion. Control microbiologico de los alimentos. Staphylococcus aureus. recuento en placa de siembra por extension en superficie. 1998. NTE INEN 1529-14.
33. Instituto Ecuatoriano de Normalizacion. Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservacion de muestras.. 1998. NTE INEN 2 169.
34. Teresa O. Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. Rev Cubana Salud Pública. 2004 marzo; III(1).
35. Díaz C, Bedirva G. Staphylococcus aureus EN QUESO BLANCO FRESCO Y SU RELACIÓN CON DIFERENTES MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD SANITARIA. RESPYN. 2001 Septiembre; II(3).
36. Calderon A, Garcia F, Martinez G. Indicadores de calidad de la leche crudas en diferentes regiones de colombia. MVZ Córdoba. 2006 Septiembre; XI(1).
37. Renate S, Carolina Uribe LM, Fernando E. CONTROL DEL DESARROLLO DE BACTERIAS ACIDO BUTIRICAS EN QUESO TIPO GOUDA EMPLEANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO Y TEMPERATURAS DE MADURACION.. Agro sur. 2005 Agosto; XXXIII(1).

CAPITULO VI

ANEXOS

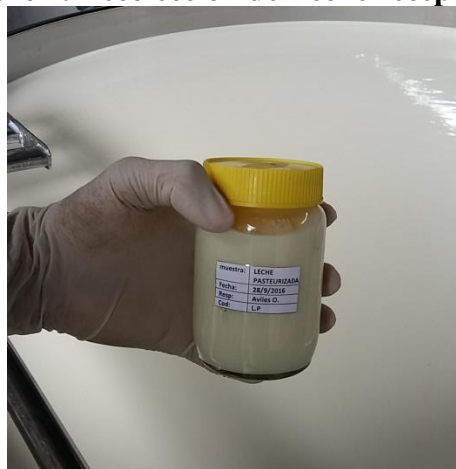
Anexo 1. Recolección De Muestra de la Tina



LUGAR: Planta Productora “CE-CE-PE”

FUENTE: Omar Aviles, 2016

Anexo 2. Recolección de Leche receptada.



LUGAR: Planta Productora “CE-CE-PE”

FUENTE: Omar Aviles, 2016

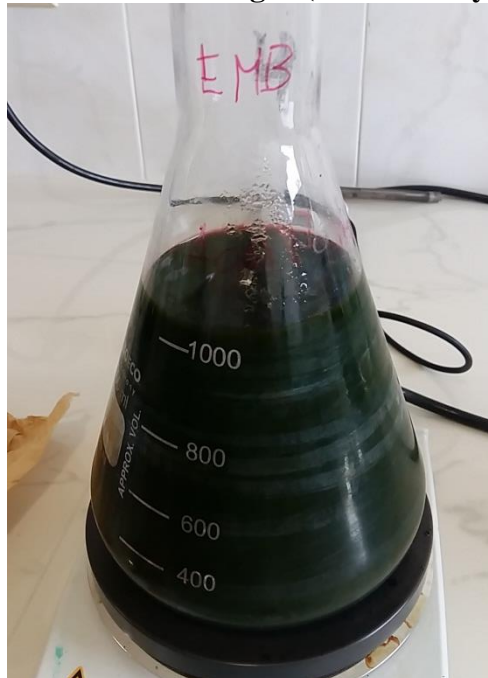
Anexo 3. Recolección de muestra de la Lira.



LUGAR: Planta Productora “CE-CE-PE”

FUENTE: Omar Aviles, 2016

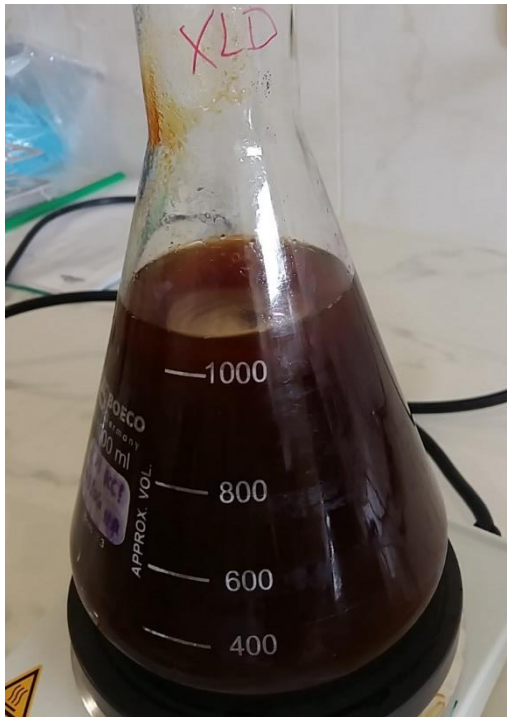
Anexo 4. Preparación de EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar)



LUGAR: Planta Productora “CE-CE-PE”

FUENTE: Omar Aviles, 2016

Anexo 5. Preparación de XLD Agar



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la U.T.E.Q.

FUENTE: Omar Aviles, 2016

Anexo 6. Esterilización de medios de cultivo y materiales de vidrio



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la U.T.E.Q.

FUENTE: Omar Aviles, 2016

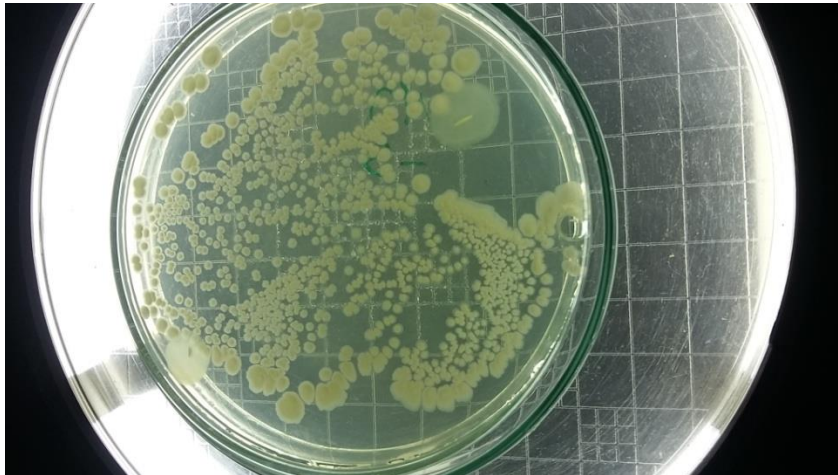
Anexo 7. Cajas petri con agar XLD.



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la U.T.E.Q.

FUENTE: Omar Aviles, 2016

Anexo 8. Crecimiento de levadura.



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la U.T.E.Q.

FUENTE: Omar Aviles, 2016

Anexo 9. Crecimiento de E. coli.



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la U.T.E.Q.

FUENTE: Omar Aviles, 2016

Anexo 10. Crecimiento de moho y levadura.

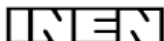


LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la U.T.E.Q.

FUENTE: Omar Aviles, 2016

Anexo 1. Normas Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1528.2012 norma general para quesos frescos no madurados. Requisitos

CDU: 637.352
ICS: 67.100.30



CIU: 3112
AL 03.01-420

<p>Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria</p>	<p>NORMA GENERAL PARA QUESOS FRESCOS NO MADURADOS. REQUISITOS</p>	<p>NTE INEN 1528:2012 Primera revisión 2012-03</p>
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 La presente Norma establece los requisitos para el queso fresco no madurado, incluido el queso fresco, destinado al consumo directo o a posterior elaboración.</p> <p>1.2 En caso que exista norma específica para una variedad de queso fresco, en particular se considerará esta.</p> <p style="text-align: center;">2. DEFINICIONES</p> <p>2.1 Para efectos de esta norma se adoptan las siguientes definiciones:</p> <p>2.1.1 Queso. Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante:</p> <p>a) Coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche descremada, leche parcialmente descremada, crema, crema de suero o leche, de mantequilla o de cualquier combinación de estos ingredientes, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los ingredientes lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso; y/o</p> <p>b) Técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado a).</p> <p>2.1.1.1 Queso madurado. Se entiende por queso sometido a maduración el queso que no está listo para el consumo poco después de la fabricación, sino que debe mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en unas condiciones tales que se produzcan los cambios bioquímicos y físicos necesarios y característicos del queso en cuestión.</p> <p>2.1.1.2 Queso madurado por mohos. Se entiende por queso madurado por mohos un queso curado en el que la maduración se ha producido principalmente como consecuencia del desarrollo característico de mohos por todo el interior y/o sobre la superficie del queso.</p> <p>2.1.1.3 Queso no madurado. Se entiende por queso no madurado el queso que está listo para el consumo poco después de su fabricación.</p> <p>2.1.2 Queso fresco. Es el queso no madurado, ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular, preparado con leche entera, semidescremada, coagulada con enzimas y/o ácidos orgánicos, generalmente sin cultivos lácticos. También se designa como queso blanco.</p> <p>2.1.3 Queso condimentado. Es el queso al cual se han agregado condimentos y/o saborizantes naturales o artificiales autorizados.</p> <p>2.1.4 Queso cottage. Es el queso no madurado, escaldado o no, de alta humedad, de textura blanda o suave, granular o cremosa, preparado con leche descremada, coagulada con enzimas y/o cultivos lácticos, cuyo contenido de grasa láctea es inferior a 2% (m/m).</p> <p>2.1.5 Queso cottage crema. Es el queso cottage al que se le ha agregado crema, de manera que su contenido de grasa láctea es igual o mayor de 4% (m/m).</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p> <p>DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, leche y productos lácteos, queso fresco no madurado, requisitos.</p>		

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

2.1.6 Queso quark (quarg). Es el queso no madurado ni escaldado, alto en humedad, de textura blanda o suave, preparado con leche descremada y concentrada, cuajada con enzimas y/o cultivos lácticos y separados mecánicamente del suero, cuyo contenido de grasa láctea es variable, dependiendo si se agrega crema o no durante su elaboración.

2.1.7 Queso ricotta. Es el queso de proteínas de suero no madurado, escaldado, alto en humedad, de textura granular blanda o suave, preparado con suero de leche o suero de queso con leche, cuajada por la acción del cabr y la adición de cultivos lácticos y ácidos orgánicos.

2.1.8 Queso crema. Es el queso no madurado ni escaldado, con un contenido relativamente alto de grasa, de textura homogénea, cremosa, no granulada, preparado solamente con crema o mezclada con leche, cuajada con cultivos lácticos y opcionales se permite el uso de enzimas adicionales en los cultivos lácticos.

2.1.9 Queso de capas. Es el queso moldeado de textura relativamente firme, no granular, levemente elástica preparado con leche entera, cuajada con enzimas y/o ácidos orgánicos generalmente sin cultivos lácticos.

2.1.10 Queso duro. Es el queso no madurado, escaldado o no, prensado, de textura dura desmenuzable, preparado con leche entera, semidescremada o descremada, cuajada con cultivos lácticos y enzimas, cuyo contenido de grasa es variable dependiendo de la leche empleada en su elaboración y tiene un contenido relativamente bajo de humedad.

2.1.11 Queso mozzarella. Es el queso no madurado, escaldado, moldeado, de textura suave elástica (pasta filamentos), cuya cuajada puede o no ser blanqueada y estirada, preparado de leche entera, cuajada con cultivos lácticos, enzimas y/o ácidos orgánicos o inorgánicos.

2.1.12 Quesillo criollo. Es el queso no madurado, escaldado, alto en humedad con textura blanda suave y elástica fabricado con leche, acidificada con ácido láctico, cuajado generalmente con cuajo líquido.

2.1.13 Queso criollo o queso de comida. Es el queso no madurado, preparado con leche, adicionado de cuajo y de textura homogénea, con desuerado natural.

2.1.14 Queso requesón. Es el producto obtenido por la concentración de suero y el moldeo del suero concentrado, con o sin la adición de leche y grasa de leche, cuyo contenido de grasa es variable.

2.1.15 Queso Descremado. Es el queso no madurado, con un contenido relativamente bajo en grasa de textura homogénea preparado con leche descremada.

2.1.16 Queso Cuartirob. Es un queso fresco tradicional, de corteza lisa y suave con aroma y sabor característico

2.1.17 Queso de Hoja. Es el queso no madurado obtenido a partir de queso criollo acidificado de forma natural en presencia de bacterias mesófilas nativas de Ecuador no patógenas; sometido a calentamiento previo al hilado, la característica es su envoltura en hoja de achira.

2.1.18 Queso Manaba. Es el queso no madurado obtenido a partir de leche, acidificado de forma natural en presencia de bacterias mesófilas nativas de la zona manabita, salado con sal en grano y colocado en moldes sin fondo para su prensado.

2.1.19 Queso amasado Lojano. Es el queso no madurado elaborado a partir de queso criollo salado y acidificado naturalmente, secado, molido y nuevamente prensado; la característica es su envoltura en hoja de achira.

2.1.20 Queso amasado Carchense. Es el queso no madurado obtenido de cuajada no cortada, de acidificación natural, molido, amasado, moldeado en moldes perforados y espolvoreado sal de consumo humano; desmenuzado manualmente, moldeado y prensado.

2.1.21 Queso Andino fresco. Es un queso no madurado, el cuerpo presenta un color que varía de blanco a crema y tiene una textura blanda (al presionarse con el dedo pulgar) que se puede cortar.

(Continua)

3. CLASIFICACIÓN

3.1 De acuerdo a su composición y características físicas el producto, se clasifica en:

3.1.1 *Según el contenido de humedad,*

- a) Duro
- b) Semiduro
- c) Semiblando
- d) Blando

3.1.2 *Según el contenido de grasa láctea,*

- a) Rico en grasa
- b) Entero ó Graso
- c) Semidescremado ó bajo en grasa
- d) Descremado ó Magro

4. DISPOSICIONES ESPECÍFICAS

4.1 La leche utilizada para la fabricación del queso fresco, debe cumplir con los requisitos de la Norma NTE INEN 10, y su procesamiento se realizará de acuerdo a los principios del Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura del Ministerio de Salud Pública.

4.2 Los límites máximos de plaguicidas no deben superar los establecidos en el Codex Alimentarius CAC/ MLR 1 en su última edición.

4.3 Los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios no deben superar los establecidos en el Codex Alimentario CAC/MLR 2 en su última edición.

5. REQUISITOS

5.1 Requisitos específicos

5.1.1 Para la elaboración de los quesos frescos no madurados, se pueden emplear las siguientes materias primas e ingredientes autorizados, los cuales deben cumplir con las demás normas relacionadas o en su ausencia, con las normas del Codex Alimentarius:

5.1.1.1 Leche y/o productos obtenidos de la leche.

5.1.1.2 Ingredientes tales como:

- a) Cultivos de fermentos de bacterias inocuas productoras de ácido láctico y/o aromas y cultivos de otros microorganismos inocuos;
- b) Cuaajo u otras enzimas coagulantes inocuas e idóneas;
- c) Cloruro de sodio;
- d) Vinagre;

(Continúa)

5.1.2 Los quesos frescos no madurados, ensayados de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con lo establecido en la tabla 1.

Tipo o clase	Humedad % max NTE INEN 63	Contenido de grasa en extracto seco , % m/m Mínimo NTE INEN 64
Semiduro	55	-
Duro	40	-
Semiblando	65	-
Blando	80	-
Rico en grasa	-	60
Entero ó graso	-	45
Semidescremado o bajo en grasa	-	20
Descremado ó magro	-	0,1

5.1.3 *Requisitos microbiológicos.* Al análisis microbiológico correspondiente, los quesos frescos no madurados deben dar ausencia de microorganismos patógenos, de sus metabolitos y toxinas.

5.1.3.1 Los quesos frescos no madurados, ensayados de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la tabla 2.

TABLA 2. Requisitos microbiológicos para quesos frescos no madurados

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Enterobacteriaceas, UFC/g	5	2×10^2	10^3	1	NTE INEN 1529-13
Escherichia coli, UFC/g	5	<10	10	1	AOAC 991.14
Staphylococcus aureus UFC/g	5	10	10^2	1	NTE INEN 1529-14
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	ausencia	-		ISO 11290-1
Salmonella en 25g	5	AUSENCIA	-	0	NTE INEN 1529-15

Donde:

- n = Número de muestras a examinar.
 m = Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.
 M = Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.
 c = Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.

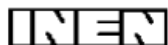
5.1.4 *Aditivos.* Se pueden utilizar los aditivos permitidos y en las cantidades especificadas en la NTE INEN 2074 y además:

- Gelatina y almidones modificados (estas sustancias pueden utilizarse con los mismos fines que los estabilizadores, a condición de que se añadan únicamente en las cantidades funcionalmente necesarias)
- Harinas y almidones de arroz, maíz y papa (estas sustancias pueden utilizarse con los mismos fines que los antiaglutinantes para el tratamiento de la superficie de productos cortados, rebanados y desmenuzados únicamente, a condición de que se añadan únicamente en las cantidades funcionalmente necesarias)

5.1.5 *Contaminantes.* El límite máximo permitido debe ser el que establece el Codex alimentarius de contaminantes CODEX STAN 193-1995, en su última edición

(Continua)

Anexo 2. Normas Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-2:99 Toma, Envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 1 529-2:99

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: Alimentos, análisis microbiológico, muestras, toma de muestras, envío de muestras, preparación de muestras.

AL 01.05-318

CDU: 614.31:579.67:543.05

CIIU: 9320

ICS: 07.100.30

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.

4. EQUIPO, MATERIAL Y DILUYENTES

4.1 Generalidades

4.1.1 El equipo y material 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 puedan 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.

4.1.2 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). 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.

4.1.3 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:

4.1.3.1 Vapor a presión de 15 libras/ pulgada² (autoclave): 121°C durante 20 min, mínimo.

4.1.3.2 Aire caliente: 170-175°C, en el punto más frío, durante 1 h, 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.

4.1.3.3 Vapor fluente: 100°C por una hora.

4.1.3.4 Agua hirviente: ebullición en agua por 20 min, mínimo.

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.

OBSERVACIÓN. Las definiciones contenidas en los numerales 3.1 al 3.18, inclusive, son según la FAO y la "International Commission on Microbiological Specifications for Foods" (ICMSF).

(Continúa)

4.1.3.5 Inmersión en etanol al 96% (v/v) y flameado hasta que el etanol se consuma. Para materiales que resisten la llama directa.

4.1.3.6 Combustión: exponer a la llama de un mechero de Bunsen o de alcohol hasta la incandescencia y enfriar. Para objetos que resistan la incandescencia.

4.2 Equipo y material

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

4.2.2 *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.

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

4.2.4 *Para controlar la temperatura:* termómetro manual de cuadrante, para controlar la temperatura ambiente y del producto.

4.2.5 *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.

4.2.6 *Para etiquetar:* etiquetas y marcadores.

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

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

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

4.2.10 *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.

4.2.11 *Equipo para homogeneizar muestras:* homogeneizadores, vortex, trituradores, "stomacher", molinos.

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

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

4.2.14 *Materiales varios:* erlenmeyers, probetas, tubos, pipetas, jeringuillas.

4.3 Diluyentes

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

4.3.2 Agua peptona tamponada: para *Salmonella*.

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

(Continúa)

4.3.4 Agua peptona sal al 5%: para halófilos moderados y halotolerantes.

4.3.5 Caldo TSB: para revitalización.

4.3.6 Caldo reforzado para clostridios: para anaerobios.

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

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

4.3.9 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.

4.3.10 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.

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

4.3.12 Solución de sacarosa al 20%: para osmófilos.

4.3.13 Solución salina peptonada: para uso general.

5. TOMA DE MUESTRAS

5.1 Disposiciones administrativas (ver nota 4)

5.1.1 La toma de muestras debe realizar un agente autorizado o un agente independiente 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).

5.1.2 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.

5.1.3 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.

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

(Continúa)

5.1.4 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:

5.1.4.1 Lugar, fecha y hora en que se realizó la toma de muestras.

5.1.4.2 Nombre y dirección del agente que realizó la toma de muestras y de los posibles testigos.

5.1.4.3 Método exacto de la toma de muestras (aleatorio en todo el lote, aleatorio en las partes accesibles o por otro método).

5.1.4.4 Procedimiento exacto utilizado para tomar las muestras, si éste difiere de las instrucciones dadas en esta norma.

5.1.4.5 Motivo de la toma de muestras.

5.1.4.6 Naturaleza del alimento.

5.1.4.7 Número y código del lote, códigos de los baches y el número y tamaño de las unidades que constituyen el lote.

5.1.4.8 Tamaño y número de las muestras de población debidamente identificadas en relación al lote, bache y/o unidad (caja, bidón, etc.) del cual proceden.

5.1.4.9 Lugar a donde se enviarán las muestras.

5.1.4.10 Ensayos solicitados.

5.1.4.11 Nombre y dirección del laboratorio que analizará las muestras.

5.1.4.12 Temperatura del producto al momento de la toma de muestras.

5.1.4.13 Origen del envío y lugar de destino.

5.1.4.14 Si es posible, el nombre y la dirección del fabricante, importador, vendedor o comprador, según proceda.

5.1.4.15 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.

5.2 Número de muestras de población que se deben tomar

5.2.1 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).

5.3 Técnicas para la toma de muestras

5.3.1 Generalidades

(Continúa)

5.3.1.1 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.

5.3.1.2 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 cada envase utilizar un instrumento estéril.

5.3.1.3 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 100 g ó cm^3 .

5.3.1.4 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 debe utilizar preservantes

5.3.1.5 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.

5.3.1.6 El tamaño de la muestra de población debe ser de 100 cm^3 o gramos, mínimo. En muchos casos será el de la unidad de producción del lote como latas herméticamente cerradas conteniendo muchas veces la cantidad de 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.

5.3.2 *Procedimientos para tomar muestras*

5.3.2.1 *Productos en envases pequeños.* Los alimentos, sean éstos líquidos, pastosos, sólidos o pulverulentos envasados en pequeños recipientes deben tomarse en su propio envase original, sin abrir.

- a) 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.
- b) 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 de 100 g.

5.3.2.2 *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 cm^3 . Si es difícil obtener una buena homogeneización, de sitios apropiados del recipiente tomar varias submuestras de manera a obtener una muestra no inferior a 100 cm^3 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 cm^3 .
- 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 cm^3 de muestra.

(Continúa)

a.3) En el caso de leche condensada y evaporada mezclar muy cuidadosamente utilizando un agitador adecuado para raspar el material 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 5 mm 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, margarinas, mantequillas a granel y el producto está en 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, incertar 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 manteniéndoles por 24 h a 10°C.

5.3.2.3 *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 6.7). 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.

5.3.2.4 *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 5.3.2.7 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.

5.3.2.5 *Toma de muestras de superficies inertes.*

a) Botellas, envases, recipientes, utensilios pueden muestrearse mediante lavado, y si es posible, con hisopo (ver 5.3.2.7 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 entra en contacto con los alimentos.

(Continúa)

- b) La toma de muestras de superficies lisas puede realizarse con hisopo (ver 5.3.2.7 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 escalpelo 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 5.3.2.7 literal b.3).

5.3.2.6 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.

5.3.2.7 Otros

- a) *Quesos grandes.* En el caso de quesos grandes tomar de las diferentes partes suficientes submuestras, 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 100 g.
- 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 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% (V/V) 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 obturar 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.

(Continúa)

- 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 4.2.2) 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 de 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 en 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) *Toma 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 sacra, 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
 - b.3) *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, tinte 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.

6. ENVÍO DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO.

- 6.1** 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.
- 6.2** Manipular y empaclar las muestras de modo que una manipulación posterior no pueda cambiar su identidad ni sugerir ninguna duda a cerca de su identidad.
- 6.3** 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.
- 6.4** 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.
- 6.5** Las latas hinchadas se deben refrigerar y enviarlas acondicionadas con mucho papel y material amortiguador y material refrigerante.

(Continúa)

6.6 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.

6.7 Productos congelados, las muestras de estos productos se deben recoger en recipientes pre-enfriados y colocarlos inmediatamente en un congelador, o en 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.

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

6.9 Enviar las muestras juntamente con el informe de la toma (ver 5.1.4).

7. RECEPCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO.

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

7.1.1 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 5.1.2 y 5.1.4).

7.1.2 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.

7.1.3 Control de la temperatura. Anotar la temperatura de las muestras perecederas no congeladas. Las muestras congeladas deben llegar al laboratorio en su estado congelado, controlar si no ha habido descongelamiento (ver 6.7). Las muestras frescas perecederas deben tener una temperatura entre 0 a 5°C. Anotar cualquier discrepancia en la hoja de registro.

7.1.4 Apego al programa de muestreo. Verificar que el número de las muestras de población está conforme con el programa de muestreo utilizado.

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

7.2.1 Productos congelados, a -20°C, máximo hasta siete días.

7.2.2 Productos perecederos no congelados, entre 0°C y 5°C, por no más de 24 horas.

7.2.3 Productos estables: enlatados, productos deshidratados, etc., a temperatura ambiente en lugares secos y frescos, hasta siete días.

7.2.4 Productos misceláneos: enjuagues, hisopos, aguas de efluentes, entre 0°C y 4°C, hasta 12 h.

(Continúa)

8. PREPARACIÓN DE LA UNIDAD DE MUESTRA PARA EL ANÁLISIS

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

8.1.1 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, deben ser lo más cortas posible y el producto se debe mantener en refrigeración durante este período.

8.1.2 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.

8.1.3 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 formar la unidad de muestra, transferir las unidades de muestreo a un recipiente estéril suficientemente grande y mezclar bien.

8.1.4 Antes de abrir cualquier envase, sean éstos rígidos o semirígidos, limpiar externamente el envase con jabón o detergente y agua, secarlos con papel toalla y, en las proximidades de la tapa o en el 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.

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

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

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

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

8.1.6.3 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.

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

8.1.6.5 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 un 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.

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

(Continúa)

8.2 Procedimiento

8.2.1 Líquidos

8.2.1.1 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 300 mm. Se puede utilizar un homogeneizador estandarizado para asegurar una distribución uniforme de los microorganismos.

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

- a) retirar una porción de líquido hasta que haya suficiente espacio de cabeza y entonces mezclar mediante agitación (ver 8.2.1.1); o
- b) transferir la muestra completa, o un parte de ella, a un envase estéril de tamaño adecuado y agitando mezclar bien (ver 8.2.1.1). En el caso de muestras líquidas con gas, incorporar unas perlas de vidrio estériles y agitar.

8.2.2 Polvos. Seguir los procedimientos indicados en 8.2.1.1 y 8.2.1.2 utilizando una espátula estéril.

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

8.2.3.1 Descongelarlas parcialmente en su recipiente original cerrado (o en el que llegó al laboratorio), por no más de 24 h en un refrigerador entre 2°C y 5°C. Cuando se necesitan más de 24 h para descongelar las muestras, se pueden colocar en un baño de agua a una temperatura menor de 37°C y se les mantiene solo 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.

8.2.3.2 Si la muestra congelada puede picarse fácilmente, el descongelamiento no es necesario.

8.2.3.3 Con productos fácilmente descongelables (productos obtenidos con taladro, por ejemplo: jujos congelados, huevos congelados, etc.), se les descongela en un baño de agua o a temperatura ambiente, según se indica en 8.2.3.1.

8.2.3.4 Los helados se funden según se indica en el numeral 8.2.3.1 (si se encuentran en su envase original primero se los transfiere a un frasco estéril con tapa). Mezclar bien la muestra fundida.

8.2.4 Mantequilla, margarinas y mantecas.

8.2.4.1 Colocar la muestra de mantequilla en el refrigerador (4°C ± 1°C), hasta que se tome dura y se pueda cortar.

8.2.4.2 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 4.3.11) 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 cm³.

8.2.4.3 En el caso de las mantecas añadir un volumen igual a dos veces la muestra: 25 g de muestra y 50 cm³ diluyente.

8.2.4.4 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 mezclen completamente.

(Continúa)

8.2.4.5 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 9.2.1.2

8.2.5 *Mayonesa*. Preparar la muestra según lo indicado en 8.2.4

8.2.6 *Carnes y otros productos*. Cuando por su naturaleza, el producto en análisis puede causar dificultades si se homogeneiza directamente, entonces, antes de manipular, asépticamente proceder según 8.2.6.1 y/o 8.2.6.2

8.2.6.1 *Picado*. Colocar el material en una superficie estéril, cortar en cubos de 1 cm³ y continuar según lo indicado en 8.2.6.2.

8.2.6.2 *Trituración*. Colocar el material (picado o no) en un frasco estéril, adicionar el exudado que hubiere, mezclar, homogeneizar dos veces y continuar según lo indicado en 9.2.2.

8.2.7 *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 9.2.1.3

8.2.8 *Hisopos o torundas*. Al tubo que contiene el hisopo juntamente con el diluyente (ver 5.3.2.7 literal b.1) 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 se indica en 9.2.1.3.

8.2.9 *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 9.2.2.

9. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN INICIAL O DILACIÓN PRIMARIA Y OTRAS DILUCIONES

9.1 Generalidades.

9.1.1 El tamaño de la unidad muestra generalmente es 10 g ó 10 cm³ o un múltiplo de 10 y, debe ser tal, que permita realizar todos los ensayos requeridos.

9.1.2 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.

NOTA 5 Con el objeto de reducir la sobrecarga de trabajo en el laboratorio, y cuando hay evidencias de que la mixtura 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 para formar una unidad 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 transfiriendo 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 10 cm³ a un frasco que contenga 1 litro de caldo selenito cistina o caldo tetratonato.

(Continúa)

9.1.3 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.

9.1.4 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.

9.1.5 La preparación de la suspensión inicial de algunos tipos de productos necesitan de cuidados especiales, tales como:

9.1.5.1 Calentar a temperaturas inferiores a 45°C por no más de 15 minutos productos como el cacao en polvo, gelatina, productos en polvo, mantecas, mantequillas. Para los quesos utilizar el diluyente a 44°C ± 1°C.

9.1.5.2 Neutralizar los alimentos ácidos con una solución estéril de fosfato tripotásico al 8%, antes de preparar la suspensión inicial.

9.1.5.3 Reconstituir los productos deshidratados y revitalizar a los microorganismos lesionados por los procesos de elaboración y almacenamiento de los productos alimenticios.

9.1.5.4 Para productos grasosos o pulverulentos que forman grumos adicionar al diluyente un agente humectante tal como el "Tergitol Aniónico 7" (1% m/v).

9.1.5.5 Cuando se va a realizar recuento de esporos, 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.

9.2 Suspensión inicial o dilución primaria (10⁻¹)

9.2.1 *Líquidos:* Productos líquidos no viscosos (agua, leche, jugos, enjuagues, etc.) en los cuales los microorganismos se distribuyen homogéneamente o que fácilmente se los puede homogeneizar 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 grasa vegetales o animales) y productos líquidos viscosos.

9.2.1.1 Líquidos no viscosos, con una pipeta estéril transferir 10 cm³ a un frasco y añadir 90 cm³ 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, en torbellino, suba hasta 2 o 3 cm del borde del vaso. Si se requieren otras diluciones, continuar según lo indicado en 9.3.

9.2.1.2 De las mantequillas y mantecas, de la fase líquida (ver 8.2.4.5) tomar 2 cm³ y añadir 8 cm³ de diluyente, se obtiene la dilución 10⁻¹. Para otras diluciones, continuar según lo indicado en 9.3.

9.2.1.3 Enjuagues, la solución de enjuague obtenida en los numerales 8.2.7 y 8.2.8 constituye la dilución primaria, siempre que, para el enjuague se utilice el volumen adecuado de diluyente (ver 5.3.2.7 literal b.1). Para otras diluciones, continuar como se indica en 9.3.

9.2.1.4 De los líquidos viscosos y helados fundidos (ver 8.2.3.4) pesar 10 g de muestra en 90 cm³ 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.

(Continúa)

9.2.2 *Productos sólidos.* (Ver notas 6)

9.2.2.1 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 cm³ de diluyente (o múltiplo de 90) a la temperatura adecuada (dilución 10⁻¹).

9.2.2.2 Hacer funcionar el homogeneizador a baja velocidad y en pocos segundos pasar a la velocidad entre 15 000 a 20 000 rpm. Cuidar escrupulosamente que el tiempo de homogeneización a alta velocidad no exceda los dos minutos. Para productos blandos o que forman mucha espuma es suficiente un minuto.

9.2.2.3 Hacer funcionar el "stomacher" 1 ó 2 minutos, según la naturaleza del producto (ver nota 6.2).

9.2.2.4 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.

9.3 *Otras diluciones.* (Ver nota 7)

9.3.1 Si la dilución primaria se homogeneizó con pipeta, utilizar la misma pipeta para transferir 1 cm³ de la suspensión inicial (dilución 10⁻¹) a otro tubo que contenga 9 cm³ de diluyente estéril a la temperatura adecuada, evitar que la pipeta entre en contacto con el diluyente y con otra pipeta estéril mezclar cuidadosamente. De esta manera se obtiene la dilución 10⁻².

9.3.2 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 cm³. Cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración.

9.4 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.

9.5 *Revitalización*

9.5.1 Los microorganismos presentes en los alimentos pueden estar lesionados o debilitados debido a los tratamientos que se utilizan en el procesado 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.

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 de 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.

NOTA 7 Para las pruebas de presencia o ausencia de microorganismos en 0,1 cm³ ó 0,1 g de producto, no se necesita preparar las siguientes diluciones.

(Continúa)