



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

TEMA DE LA TESIS

**“CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA CARNE BOVINA COMERCIALIZADA
EN EL CANTÓN BUENA FÉ”**

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN ALIMENTOS

AUTOR:

Willian Fernando Quispe Cortes

DIRECTOR

Ing. Zoot. Orly Cevallos Falquez MSc.

QUEVEDO – ECUADOR

2014



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**TEMA “CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA CARNE BOVINA,
COMERCIALIZADA EN EL CANTÓN BUENA FE”**

Presentado al Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del
título de:

INGENIERO EN ALIMENTOS

Aprobado:

Dr. Raúl Díaz Ocampo
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE TESIS

Ing. Édison Mazón Paredes M.Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE TESIS

Ing. Víctor Godoy Espinoza M.Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE TESIS

QUEVEDO – LOS RIOS – ECUADOR

2014

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo: Willian Fernando Quispe Cortes, 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 normativa institucional vigente.

Willian Fernando Quispe Cortes

CERTIFICACIÓN

El suscrito, Ing. Orly Cevallos Falquez, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica:

Que el egresado Willian Fernando Quispe Cortes, realizó la tesis de grado previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos, titulada “**Calidad microbiológica de la carne bovina, comercializada en el cantón Buena fe**”, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Orly Cevallos
Director de Tesis

AGRADECIMIENTO

A ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A la UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

A mi Co-director de tesis, M.Sc. Joaquín Moran Bajaña por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mis estudios con éxito.

A mi Director de tesis, Ing. Orly Cevallos por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis.

Al Ing. Víctor Godoy mis más sincero agradecimiento no sólo por la formación académica, la cual sin duda fue muy importante, sino también por la confianza depositada en mí y por su ejemplo de trabajo y dedicación.

Al ing. Raúl Díaz le agradezco por todo el apoyo brindado a lo largo de la carrera, por su tiempo, amistad y por los conocimiento transmitidos.

Al Ing. Edison Mazon por sus consejos y conocimiento, impartidos en el salón de clase.

A los Ing. Wistong Morales, Cristhian Vallejo, Franklin Peláez, Martin Gonzales, German Jácome, Edgar Pinargote, Ítalo Espinoza, etc. Influyendo con sus lecciones y experiencias en mi proceso como estudiante.

Gracias también a mis queridos compañeros, que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante estos 5 años de convivir dentro y fuera del salón de clase. Diana, Gisela, Yoslin, Pablo, Graciela, Kerly, Teresa, Marcos, Evelin.

DEDICATORIA

A Dios porque ha bendecido cada paso que he dado, cuidándome y dándome fortalezas para continuar.

A mis Padres Fernando Quispe y Jacqueline Cortes, que con sus consejos han hecho de mi un hombre de bien, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento, depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi capacidad de salir adelante, gracias a ellos soy lo que soy ahora.

A mi segundo padre, mi tío Darwin Quispe que por circunstancias de la vida decidió migrar dejando atrás a su familia para buscar un mejor futuro y que sin su apoyo moral no había sido posible lograr alcanzar esta meta que no es solo mía sino de todos mis seres queridos que los amo con mi vida.

A mis hermanos por estar siempre presente, acompañándome

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Pagina
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	I
CERTIFICACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTO.....	III
DEDICATORIA.....	IV
RESUMEN.....	XI
SUMMARY.....	XII

CAPÍTULO I

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.INTRODUCCION.....	2
1.2.PROBLEMATIZACION.....	3
1.3.JUSTIFICACION.....	4
1.4.OBJETIVOS.....	5
1.4.1. Objetivo General.....	5
1.4.2. Objetivos Específicos.....	5
1.5.HIPOTESIS.....	6

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1.CONCEPTO DE CALIDAD.....	8
2.1.1. Indicadores de la calidad.....	8
2.2.CARNE.....	9
2.2.1. Definición.....	9
2.2.2. Composición de la carne.....	9
2.2.3. Métodos de conservación de la carne.....	9
2.2.3.1. Control de temperatura.....	9
2.2.3.2. Refrigeración.....	10
2.2.3.3. Congelación.....	10

Contenido	Página
2.2.3.4. Conservación Química.....	11
2.2.3.5. Adición de sustancias química.....	11
2.2.3.6. Ahumado.....	12
2.2.4. Seguridad alimentaria.....	12
2.2.4.1. Disponibilidad de alimentos.....	13
2.2.4.2. Acceso a los alimentos.....	13
2.2.4.3. Utilización.....	13
2.2.4.4. Estabilidad.....	13
2.3.ALTERACIÓN DE LAS CARNES.....	14
2.3.1. Efectos causados por los microorganismos.....	14
2.3.2. Factores que contribuyen a la contaminación de la carne.....	15
2.3.2.1. Congelación.....	15
2.3.2.2. Cocinado.....	16
2.3.2.3. Contaminación cruzada.....	16
2.4.FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS	17
2.4.1. Temperatura.....	17
2.4.2. Actividad de agua (Aw)	17
2.4.3. Ph.....	18
2.4.4. Humedad Relativa.....	18
2.4.5. Humanos.....	19
2.5.MICROORGANISMOS ALTERANTES DE LA CARNE ROJA	19
2.5.1. Crecimiento y multiplicación.....	19
2.6.BACTERIAS ASOCIADAS A LA CARNE DE RES.....	19
2.6.1. Escherichiacoli.	20
2.6.1.1. Escherichia coli enteropatógenos.....	20
2.6.1.2. E.coli entero toxígenos.....	21
2.6.1.3. E. coli entero invasivas.....	22

Contenido	Página
2.6.1.4. E.coli enterohemorrágicas.....	22
2.6.1.5. E. Coli entero adherentes.....	23
2.6.2. Salmonella.....	23
2.6.2.1. Crecimiento.....	26
2.6.2.2. Sobrevivencia.....	26
2.6.2.3. Inactivación.....	26
2.6.3. Staphylococcus aureus.....	26
2.6.3.1. Epidemiología.....	27
2.7.IMPORTANCIA DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS.....	28
2.7.1. Control Microbiológico de la carne	28
2.7.2. Requisitos microbiológicos de la carne bovina en el ecuador.....	30

CAPITULO III

METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

3.1.MATERIALES Y METODOS.....	33
3.1.1. Recursos humanos.....	33
3.1.2. Recursos de laboratorio.....	33
3.1.4. Recursos Químicos.....	33
3.1.5. Recursos Físicos.....	33
3.1.6. Localización del experimento.....	34
3.1.7. Identificación.....	35
3.1.7.1. Variables.....	35
3.1.8. Tipo y diseño de la investigación.....	35
3.1.9. Población, muestra o grupo de estudio.....	35
3.1.10. Técnicas de levantamiento de información y procedimientos analíticos.....	36
3.1.10.1. Determinación de Mesófilos Aerobios.....	37
3.1.10.2. Determinación de Salmonella spp.....	37
3.1.10.3. Determinación de coliformes fecales.....	38

3.1.10.4.	Detección de recuento Staphylococcus aureus.....	39
-----------	--	----

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUCIONES

4.1...	CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LA CARNE DE RES....	42
4.1.1.	Resultados del nivel de contaminación por microorganismo mesofilos aerobios de en las muestras de carne bovina comercializada en el cantón Buena Fe, 2014	42
4.1.2.	Conteo de coliformes fecales	43
4.1.3.	Determinación de Salmonella spp.....	44
4.1.4.	Determinación de Staphylococcus aureus	46
4.1.5.	Genero de bacterias circulantes.....	47
4.1.6.	Mano de Obra que Laboran en los Negocios Cárnicos del Cantón Buena Fe.....	47
4.1.7.	Horarios de atención en los Centros Cárnicos del Cantón Buena fe.....	48
4.1.8.	Materia Prima Vendida en los Centros Cárnicos del Cantón Buena fe.....	48
4.1.9.	Piezas carnicas que se comercializan en el Cantón Buena fe.....	49
4.1.10.	Almacenamiento en los centros cárnicos del Cantón Buena fe.....	50
4.1.11.	Servicios básicos en los Locales del Comercio del Cantón Buena Fe.....	50
4.1.12.	Material de Limpieza Utilizadas en los Céntros Cárnicos del Cantón Buena fe	51
4.1.13.	Formal de Colgamiento de la Carne	52
4.1.14.	Equipos de Faenamientos que se Utilizan en los Centros Cárnicos del Cantón Buena fe.....	52
4.1.15.	Régimen de propiedad de los Centros Cárnicos del Cantón Buena fe.....	53
4.1.16.	Ropa de Trabajo que se Utiliza en los Centros cárnicos del Cantón Buena fe.	53
4.1.17.	Característica del local de los centros cárnicos	54

4.1.18. Prueba de Kruskal Wallis.....	55
---------------------------------------	----

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES.....	57
5.2. RECOMENDACIONES.....	58

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

LITERATURA CITADA	60
-------------------------	----

CAPÍTULO VII

ANEXOS

ANEXO 1 CUESTIONARIO DESTINADO A LOS COMERCIALIZADORES DE CARNE DE RES	67
ANEXO 2 RECOLECCION DE MUESTRA EN LOS DIFERENTES EXPENDIOS DEL CANTON BUENA FE	68
ANEXO 3 MATERIAL DE VIDRIO ESTERILIZADO	69
ANEXO 4 PREPARACIÓN Y ESTERELIZACION DE MEDIO DE CULTIVO STANDARD METHODS AGAR PARA LA DETERMINACION DE MESOFILOS AEROBIOS	69
ANEXO 5 INOCULACION Y HOMOGENIZACION DE LA MUESTRA PARA LA DETERMINACION DE MESOFILOS AEROBIOS	70
ANEXO 6 INCUBACION DE LAS MUESTRAS A 30 °CPARA LA DETERMINACION DE MESOFILOS AEROBIOS	70
ANEXO 7 CONTEO DE COLONIAS DE MESOFILOS AEROBIOS	71
ANEXO 8 MUESTRAS DE CARNES EN AGUA PEPTONA INCUBADA A 37 ° CPARA LA DETERMINACION DE SALMONELLA	71

ANEXO 9 TRANSFERENCIA DE 1 ml DE SOLUCION HOMOGENIZADA A AGUA PEPTONA TAMPONADA BUFFERADA PARA LA DETERMINACION DE SALMONELLA.....	72
ANEXO 10 ENRIQUECIMIENTO DE LA SOLUCION ANTERIOR CON CALDO RAPPAPORT VASSILLIADIS Y TETRATONIATO.....	73
ANEXO 11 SIEMBRA E INCUBACION EN XLD AGAR	74
ANEXO 12 PESADO Y HOMOGENIZADO DE LA MUESTRA PARA LA DETERMINACION DE COLIFORMES FECALES	75
ANEXO 13 TRANSFERENCIA DE 1 ML DE LAS DILUCIONES A CALDO BGBL CON SU REPECTIVA CAMPANA DURHAM PARA LA DETERMINACION DE COLIFORMES FECALES	76
ANEXO 14 TUBOS CON PRODUCCION DE GAS Y SEMBRADO EN AGAR LEVINE RESPECTIVAMENTE	77
ANEXO 15 TUBOS DE ENSAYO CON MEDIOS SIM Y TSI SEMBRADO RESPECTIVAMENTE.....	78
ANEXO 16 PRUEBA BIOQUIMICA MEDIANTE EL REACTIVO DE KOVACS	79
ANEXO 17 CAJAS PETRI CON AGAR BAIRD PARKER Y ERLLEN MEYER CON AGUA PETONADA	80
ANEXO 18 COLONIAS NEGATIVAS DE S. AUREUS	82
ANEXO 19 NTE INEN 1529-15:2009.....	83
ANEXO 20 NTE INEN 768.....	102
ANEXO 21 NTE INEN 1529-8.....	112
ANEXO 22 NTE INEN 1529-5.....	120
ANEXO 23 STANDARD METHODS AGAR.....	128
ANEXO 24 Baird Parker agar	129
ANEXO 25 Agar Nutritivo.....	130
ANEXO 26 Agar XLD.....	131
ANEXO 27 Agar Levine (Agar eosina-azul de metileno).....	132
ANEXO 28 SIM Medio	133
ANEXO 29 Prueba de Kruskal Wallis.....	134

RESUMEN

Se planteó una investigación cuyo objetivo fue evaluar la calidad microbiológica de la carne bovina comercializada en el Cantón Buena Fe y conocer su grado de contaminación. Para el control de la conformidad microbiológica se aplicó la Norma INEN 1338-2012; se sometió a un censo, a los operarios de las tercenas y centros cárnicos, empleando un cuestionario sobre tópicos de salubridad e higiene. Los resultados obtenidos evidenciaron la ausencia de microorganismos patógenos relacionados con la inocuidad del producto no obstante existió una alta carga de mesófilos aerobios por encima de la norma, además se encontró como carga contaminante a especies bacterianas de los géneros *Flavobacterium* y *Bifidobacterium* lo cual permite concluir que se deben corregir las condiciones de insalubridad. Se recomienda brindar cursos de capacitación al personal operativo de los lugares de expendio sobre las Buenas Prácticas de Manufactura; estudiar el impacto que tienen los medios de transporte y factores externos, sobre la calidad microbiológica de la carne bovina comercializada en el cantón Buena Fe.

PALABRAS CLAVES:

Patógenos, norma INEN-1338-3, BPM, carga contaminante, mesófilos aerobios, carne, inocuidad

SUMMARY

Research aimed to evaluate the microbiological quality of the beef sold in the Buena Fé city and know their degree of contamination was raised. For the control of microbiological compliance INEN Standard 1338-2012 was applied; underwent a census of operators and meat terseness centers using a questionnaire on health and hygiene topics. The results showed the absence of pathogens related to product safety, however there was a high burden of aerobic mesophilic above rule also was found as pollutant load to bacterial species of the genera Flavobacterium and Bifidobacterium which allows to conclude that must correct the unsanitary conditions. The null hypothesis is rejected "The microbiological quality of beef expended in Canton Good Faith, are within the standard NTE INEN-1338-3" (Requirements for Meat and Meat products in general). It is recommended to provide training to the operating staff of the places of sale on Good Manufacturing Practices; study the impact of transport and external factors on the microbiological quality of the beef sold in the Canton Good Faith.

KEYWORDS:

Pathogens, INEN-1338-3 standard, BPM, pollutant load, aerobic mesophilic bacteria, meat safety

CAPITULO 1

MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN

Buena Fe es una ciudad ubicada en el centro del Ecuador, su actividad económica principal es la agropecuaria. En relación a la producción ganadera el cantón tiene 7,201 cabezas de ganado vacuno que representa el 6.11% del total provincial (INEC, 2010) Por otra parte, el proceso de faenamiento de la carne bovina en este municipio, según se ha observado, incumple la Buenas Prácticas de Faenamiento y las Buenas Prácticas de Higiene, lo que supone un serio riesgo para la salud de los consumidores; el riesgo se incrementa, si se le añade la inadecuada manipulación del producto en los puntos de venta al detalle y en el hogar del consumidor.

El consumo per cápita de carne bovina en algunos países industrializados es alto a diferencia del Ecuador, un país en vías de desarrollo con un acceso de 9 kg anuales (FAO, 2014). (Cobbaut, 2012), menciona que los productos cárnicos de origen vacuno pueden contaminarse en cualquiera de las etapas del procesamiento mediante el contacto de las heces con las canales o contenido gástrico, ya que el ganado es un reservorio natural de microorganismos patógenos para el humano.

Es importante contar con información obtenida bajo un rigor que garantice su utilidad y veracidad, por lo que la presente investigación pretende aportar con datos que permitan la toma de decisiones en materia de control de los puntos de venta de los productos cárnicos, basados en un monitoreo microbiológico de las condiciones en que se expende la carne.

Por todo lo anterior el propósito de la investigación fue realizar una evaluación microbiológica de la calidad de la carne bovina, comercializada en el cantón Buena Fé, tomando como base las normas técnicas establecidas por el instituto Ecuatoriano de Normalización INEN.

1.2. PROBLEMATIZACIÓN

Desde hace mucho tiempo se ha venido observando que en el Cantón Buena Fé se produce y comercializa, desde el punto de vista higiénico-sanitario, un producto no inocuo a los clientes estimando que la carne y las condiciones ambientales ofrecen condiciones altamente favorables a la microbiota contaminante de la misma, hecho que se intensifica con la inapropiada manipulación por parte de los operarios en los locales de comercio.

El problema radica en que los animales son transportados y faenados en circunstancias inapropiadas hacia los puntos de venta que también pueden presentar condiciones de insalubridad, sin aplicar por lo menos las buenas prácticas de higiene que garanticen la calidad higiénica del producto.

1.3. JUSTIFICACIÓN

Es importante realizar este tipo de estudio ya que los resultados esperados tributan a una propuesta de control y monitoreo de un producto tradicionalmente consumido por el hombre.

Existen sospechas por la falta de cultura higiénica y sanitaria en la manipulación de los alimentos y en especial de la carne bovina por parte de los expendedores en los puntos de venta, debido a las condiciones de comercialización, la cual se la hace al aire libre y el operario generalmente no aplica una conducta de limpieza constante en el lavado de mano y utensilios empleados en el proceso de manera general.

Por lo tanto las autoridades de control de higiene de los alimentos a nivel municipal como el departamento de higiene y los mismo actores involucrados

en el negocio cárnico pueden acceder y contar con información real producto de la investigación y toma de decisiones para evitar un producto contaminado.

Así mismo contribuirá con el desarrollo y aplicación de una cultura de higiene y salubridad en la manipulación de la carne.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo General

Evaluar la calidad microbiológica de la carne bovina, comercializada en el cantón Buena Fe en la época de verano del 2014.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Identificar los géneros de bacterias presentes en la carne bovina que se comercializan en el cantón Buena Fe relacionados con las normas. NTE INEN 1529-8, 1529-5, 1529-15,768.
- Determinar la carga de mesófilos aerobios que contamina la carne de bovino en la época de verano del 2014.
- Valorar la presencia de Coliformes fecales en las canales de bovinos del cantón Buena Fe en la época de verano.

1.5. HIPÓTESIS

- H₀ En la carne de bovino que se comercializa en el cantón Buena fe no se puede identificar un género de bacterias de acuerdo con las normas NTE INEN-1338-3.
- H₁ En la carne de bovino que se comercializa en el cantón Buena fe al menos se podría identificar un género de bacterias de acuerdo con las normas NTE INEN-1338-3
- H₀ En la carne de bovino que se comercializa en el cantón Buena fe no se puede determinar la existencia de mesofilos aerobios que pudieran contaminar las canales en la época de verano del 2014 de acuerdo con las normas NTE INEN-1338-3.
- H₁ En la carne de bovino que se comercializa en el cantón Buena fe se podría determinar la existencia de mesofilos aerobios que pudieran contaminar las canales en la época de verano del 2014 de acuerdo con las normas NTE INEN-1338-3.
- H₀ En la carne de bovino que se comercializa en el cantón Buena Fe no se puede diagnosticar uno de los géneros de coliformes fecales que pudieran contaminar las canales en la época de verano del 2014 de acuerdo a las normas NTE INEN-1338-3.
- H₁ En la carne de bovino que se comercializa en el cantón Buena Fe al menos se podría diagnosticar uno de los géneros de coliformes fecales que contaminar las canales en la época de verano del 2014 de acuerdo a las normas NTE INEN-1338-3.

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO

2.1. CONCEPTO DE CALIDAD

Conjunto de atributos que hacen referencia de una parte a la presentación, composición y pureza, tratamiento tecnológico y conservación que hacen del alimento algo más o menos apetecible al consumidor y por otra parte al aspecto sanitario y valor nutritivo del alimento (Ergonomista, 2009).

2.1.1. Indicadores de la calidad

Control de calidad es una herramienta que permite planear, hacer, verificar y actuar, permitiendo la estandarización de los procesos y dando la oportunidad de mejorar continuamente de acuerdo a los parámetros máximos y mínimos establecidos por las normas reguladoras (Ley 9/79, el Decreto 3075/97) (Gomez, 2013).

Según ISO NTC 9000/2000 define el concepto de control de calidad como el grado en el que un conjunto de características inherentes, cumplen con las necesidades o expectativas establecidas que pueden ser implícitas dentro de un proceso.

Muchos organismos se pueden usar para medir la calidad de un alimento. Los alimentos pueden tener unos organismos creciendo sobre ellos, cuya presencia puede indicar una menor calidad del alimento. Si proliferan perjudicarán la calidad del producto (Massaguer, 2011).

El mismo autor menciona que existen una serie de características que se han de cumplir para que pueda ser un indicador de calidad.

- Ha de estar presente y ser detectable en los alimentos que queramos valorar su calidad.
- La multiplicación del organismo y su número deben estar en relación negativa directa a la calidad del alimento.
- La detección y el recuento del organismo han de ser sencillos, y a ser posible que la flora acompañante no interfiera en el proceso.

- El crecimiento del indicador no debe ser obstaculizado por el indicador.
- El tiempo de recuento a de ser lo más corto posible.

2.2. CARNE

2.2.1. Definición

Según las normas NTE INEN 1217 Carne es Tejido muscular estriado en fase posterior a su rigidez cadavérica (post-rigor), comestible, sano y limpio de animales de abasto que mediante la inspección veterinaria oficial antes y después del faenamiento son declarados aptos para consumo humano.

2.2.2. Composición de la carne

Aunque el consumidor puede elegir la carne en primer lugar por su apariencia atractiva, o por costumbre, es importante no olvidar su valor nutritivo.

La mayor parte del contenido de la carne es de origen proteico, generalmente colágeno o elastina. El colágeno se rompe en gelatina cuando se cocina al calor en ambientes húmedos; por otra parte, la elastina se mantiene inalterada al ser cocinada. El contenido proteico se reparte entre la actina y la miosina, ambas responsables de las contracciones musculares(Martell, 2014).

2.2.3. Métodos de conservación de la carne

2.2.3.1. Control de temperatura

La temperatura es el factor ambiental que se puede regular más fácilmente para controlar la carga microbiana por un tiempo determinado, aunque también se pueden utilizar otros agentes como algunos compuestos químicos (Morales, 2012).

Las altas temperaturas son perjudiciales y letales para la mayoría de los microorganismos. Por otro lado, las bajas temperaturas retardan

considerablemente el metabolismo, disminuyendo el riesgo de desarrollar microorganismos (Morales, 2012).

El mismo autor menciona que no existen métodos de conservación infalibles, mucho menos cuando se trata de refrigeración y congelación. Estos métodos sólo detienen el desarrollo de los microorganismos en los alimentos. Cuando la temperatura aumenta, los microorganismos se activan nuevamente.

La refrigeración y la congelación son métodos bien conocidos para la conservación de los alimentos (Jawets, 1996).

2.2.3.2. Refrigeración

La refrigeración es el tratamiento de conservación de alimentos más extendido y el más aplicado, tanto en el ámbito doméstico como industrial. Su aplicación tiene la clara ventaja de no producir modificaciones en los alimentos hasta el punto que, tanto productores como consumidores, entienden que los alimentos frescos son en realidad refrigerados (Jerez, 2002).

El mismo autor menciona que la eficacia de la refrigeración se debe básicamente a que la actividad de los microorganismos y de las enzimas (proteínas activas) de los microorganismos y de los propios alimentos puede verse enlentecida, con el consiguiente retraso en la degradación de los componentes de los alimentos. En consecuencia, los alimentos duran más tiempo. Al mismo tiempo, los microorganismos patógenos van a inhibirse en su crecimiento, por lo que se va a permitir mantener las condiciones de seguridad de los alimentos.

2.2.3.3. Congelación.

La congelación permite conservar nuestros alimentos por largos periodos de tiempo. Gracias a las bajas temperaturas (inferiores a 24°C bajo cero) se detiene la actividad bacteriológica y enzimática que descompone los

alimentos. Para obtener buenos resultados y garantizar la inocuidad y la calidad de los alimentos (Cabañas, 2006).

Jerez (2004), Los microorganismos Gram negativos son mucho más sensibles a la acción del frío. En este grupo encontramos a todas las especies de la familia de las enterobacterias, y en consecuencia, a microorganismos responsables de la mayor parte de las toxiinfecciones alimentarias en el mundo, como son Salmonella y Escherichiacoli.

2.2.3.4. Conservación Química

El beneficio de las propiedades conservadoras de algunas sustancias químicas ha originado una infinidad de métodos de conservación.

La operación de conservar los alimentos es un método aplicado desde la prehistoria, aun cuando el hombre desconocía su base científica, conoció los efectos benéficos de utilizar sustancias químicas como la sal y el humo (Gutierrez, 2000).

El mismo autor menciona que las funciones conservadoras de las sustancias químicas han tenido como finalidad prolongar la vida útil de muchos alimentos para el consumo, debido a sus propiedades como:

- a) Antipardeamiento: obstaculizar o frenar el desarrollo de reacciones enzimáticas.
- b) Antioxidante: obstaculizar o frenar el desarrollo de reacciones oxidativas.
- c) Antimicrobiana: destruir la población microbiana contaminante, o al menos inhibir su crecimiento.

2.2.3.5. Adicción de sustancias químicas

Los conservadores químicos son sustancias que a muy bajas concentraciones inhiben la actividad de los microorganismos y constituyen uno de los métodos

universalmente aceptados para la conservación de los alimentos, además de ser los que menos desventajas presentan (García, 2012).

Los beneficios que proporcionan los aditivos químicos son: (Gutierrez, 2000).

1) Un efecto bacteriostático: inhibición de la multiplicación de los microorganismos.

2) Un efecto bactericida: destrucción de la vida celular microbiana.

Los aditivos químicos intervienen eficazmente sobre los microorganismos debido a que actúan sobre la pared y/o membrana celular, así como en el material genético o en la actividad enzimática del citoplasma celular.

2.2.3.6. Ahumado

Según Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002, el ahumado se define como el procedimiento por el que se aplica a los alimentos humo para conferir sabor a éstos y reforzar su color, olor o ambos, pudiendo prolongar la vida de anaquel de los mismos.

(Gutierrez, 2005), Este método se basa en el uso del humo al que se expone el alimento, el cual se produce por la combustión de materias primas como resinas, provenientes de árboles como el nogal, árboles de frutas, el fresno, entre otros.

2.2.4. Seguridad alimentaria

FAO (1996), menciona que existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana. Esta definición, comúnmente aceptada, señala las siguientes dimensiones de la seguridad alimentaria:

2.2.4.1. Disponibilidad de alimentos

Existencia de cantidades suficientes de alimentos de calidad adecuada, suministrados a través de la producción del país o de importaciones (comprendida la ayuda alimentaria).

2.2.4.2. Acceso a los alimentos:

Acceso de las personas a los recursos adecuados (recursos a los que se tiene derecho) para adquirir alimentos apropiados y una alimentación nutritiva. Estos derechos se definen como el conjunto de todos los grupos de productos sobre los cuales una persona puede tener dominio en virtud de acuerdos jurídicos, políticos, económicos y sociales de la comunidad en que vive (comprendidos los derechos tradicionales, como el acceso a los recursos colectivos).

2.2.4.3. Utilización:

Utilización biológica de los alimentos a través de una alimentación adecuada, agua potable, sanidad y atención médica, para lograr un estado de bienestar nutricional en el que se satisfagan todas las necesidades fisiológicas. Este concepto pone de relieve la importancia de los insumos no alimentarios en la seguridad alimentaria.

2.2.4.4. Estabilidad:

Para tener seguridad alimentaria, una población, un hogar o una persona deben tener acceso a alimentos adecuados en todo momento. No deben correr el riesgo de quedarse sin acceso a los alimentos a consecuencia de crisis repentinas (por ej., una crisis económica o climática) ni de acontecimientos cíclicos (como la inseguridad alimentaria estacional). De esta manera, el concepto de estabilidad se refiere tanto a la dimensión de la disponibilidad como a la del acceso de la seguridad alimentaria.

2.3. ALTERACIÓN DE LAS CARNES

El interés en la bacteriología de los alimentos se centraliza en su alteración o descomposición y en la transmisión de enfermedades (Jawets, 1996).

Aliaga (2009), describe que si las condiciones en las que se encuentra las carnes no son las adecuadas técnicamente, éstas son susceptibles de sufrir alteraciones, causando descomposición y hasta la putrefacción. La causa de estas alteraciones se debe a la presencia de microorganismos, que actúan sobre los compuestos químicos que tiene la carne y productos cárnicos dependiendo del grado de contaminación, del tipo de gérmenes, de la intensidad de los cambios producidos, las carnes pueden llegar a ser incomedibles.

En general, la calidad microbiológica de las canales está condicionada por las propias características de cría del animal, incluido su estado sanitario en el momento del sacrificio, el proceso de obtención de la carne y su posterior procesado. La conjunción de estos factores junto con otros de carácter ambiental, sobre todo la temperatura de almacenamiento, determinarán la microbiota característica de la carne (Calleja, 2006).

2.3.1. Efectos causados por los microorganismos.

En el caso que haya carnes contaminadas con microorganismos, apreciarán en ellas diversos signos, dependiendo donde se encuentren, si superficialmente o en la parte profunda, clase y entidad de gérmenes existentes. Los microorganismos que conducen la descomposición bacteriana, atacan a las albúminas de carne por acción enzimática, desdoblando las proteínas en compuestos más simples y solubles, los cuales son propicios para dichos microorganismos (Warris, 2003).

Aliaga (2009), menciona que los principales efectos del ataque de microorganismos en las carnes son los siguientes:

a) Limo Superficial

Generalmente en carcasas más conservadas, se aprecia una capa viscosa, como un limo en la superficie de ellas, indicando contaminación bacteriana; posibles géneros Pseudomonas, Achromobacter, Streptococcus, Leuconostoc, Bacillus y Micrococcus.

b) Cambio de Coloración

Con el avance de la contaminación se va apreciando una gran multiplicación de colonias de microorganismos, que pueden ser bacterias, hongos o levaduras, originando manchas de diversas tonalidades según sea estos microorganismo; así si son bacterias del genero Pseudomonas pueden dar una coloración roja o azul verdoso, del genero Micrococcus y del genero Flavobacterium, color amarillento, del genero Sarcinas ,Micrococcusy alguna levaduras, color rosado o rojas. Ataques de hongo, mohos Penicilium, Cladosporium, manchas de coloración negruzca, blanca y azul verdoso.

c) Olores y Sabores

Como consecuencia de un avance del grado de contaminación, se pueden apreciar en las carnes contaminadas determinados olores y sabores extraños, acre, picante, medio agrio, por los cambios físico-químicos en los componentes químicos de las carnes llegando a casos extremos, olores pútridos, nauseabundos, cuando la descomposición es muy avanzada.

2.3.2. Factores que contribuyen a la contaminación de la carne

En la preparación de los alimentos se producen muchas malas prácticas que permiten la contaminación, supervivencia y crecimiento de bacterias que originan intoxicación por alimentos (Girón, 2004).

2.3.2.1. Congelación

La congelación, en contra de lo que muchos creen, no produce la destrucción de los microorganismos por lo que una descongelación incorrecta favorece su multiplicación y el desarrollo de enfermedades de transmisión alimentaria. Lo

ideal es descongelar los productos en refrigeración con antelación suficiente (Velzid, 2012).

2.3.2.2. Cocinado

Toda manipulación supone un riesgo así que cuanto más se manipule un producto, mayor es ese riesgo. Y este riesgo aumenta cuando en la receta nos dicen que parte de lo que hemos elaborado necesita reposar un tiempo para ganar sabor. Sería necesario aplicar los mismos criterios de buen cocinado, correcta protección y conservación del alimentos pero a veces no se hace y estos alimentos contaminados pueden suponer un riesgo para la salud (Velzid, 2012)

2.3.2.3. Contaminación cruzada

Frizzo y Signorin (2009), manifiesta que el orden seguido durante la preparación de los platos cuando se sirven alimentos que se consumen crudos combinados con alimentos de cocción previa, así como los hábitos del lavado de manos y de las tablas donde se elabora los alimentos, son los principales factores de riesgo de contaminación cruzada de VTEC entre la carne cruda y las verduras.

2.4. FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

Los microorganismos están presentes en el ambiente vital del hombre (agua, suelo, aire, etc.), en el propio hombre y en todos los seres vivos, plantas o animales. La contaminación de alimentos se produce desde cualquiera de estas fuentes, más tarde las operaciones de procesado y distribución proporcionan nuevas posibilidades de contaminación (Fernandez, 2000).

2.4.1. Temperatura

Caimanque (2014), La temperatura es uno de los parámetros ambientales más importantes que condicionan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. La temperatura afecta a la velocidad de crecimiento (y, por lo tanto al tiempo de generación, g). Cada bacteria (y suponiendo que el resto de condiciones ambientales se mantienen constantes) muestra una curva característica de tasa de crecimiento en función de la temperatura, donde podemos distinguir tres puntos característicos llamados temperaturas cardinales:

- a) temperatura mínima: por debajo de ella no hay crecimiento
- b) temperatura máxima: por encima de ella tampoco existe crecimiento.
- c) Temperatura óptima: permite la máxima tasa de crecimiento.

2.4.2. Actividad de agua (Aw)

Gálvez *et.al.* (2006), menciona que la actividad de agua (aw) es un parámetro que indica la disponibilidad de agua en un alimento para que existan reacciones químicas, bioquímicas (p.e. oxidación de lípidos, reacciones enzimáticas, reacción de Maillard) y desarrollo microbiano. Por esto la actividad de agua es un parámetro bastante usado como indicador para predecir la vida útil de un alimento.

Tabla 1: Aw de algunos alimentos.

ALIMENTOS	Aw
Leche	0,99
Carne	0,98
Vegetales y Huevos	0,97
Queso y pan	0,93 – 0,96
Mermeladas	0,82 - 0,94
Frutas secas	0,72 - 0,80
Harinas	0,70
Galletas tipos cracker	0,60

Fuente: (Patiño, 2009).

2.4.3. Ph

La durabilidad de la carne tiene relación directa con su acidez(libby, 1986).

Varnam (1995), menciona que la mayoría de organismos tienen un límite óptimo de pH bastante estrecho, habitualmente en el intervalo 5.5-6.5. Debe determinarse el óptimo de pH para cualquier especie en cada caso. La velocidad de crecimiento puede, sin embargo, disminuir ligeramente a bajos valores de pH, ya que algunos organismos tienen un pH óptimo tan bajo como 2 y otros que pueden aumentar con un pH alto como de 8.5. Esto también puede ejercer un débil efecto selectivo, pero generalmente se considera que el pH en el intervalo 5.5-7 no afecta a la composición general de la microflora.

2.4.4. Humedad Relativa

Influye directamente en la actividad de agua del alimento. Si un alimento con baja actividad de agua se guarda en una atmósfera con humedad relativa alta, la actividad de agua de este alimento aumentará permitiendo el deterioro debido a los microorganismos(Jenkins, 2014).

2.4.5. Humanos

Los seres humanos pueden introducir patógenos en los alimentos, durante la producción, el procesamiento, la distribución y/o la preparación de los mismos. Todas las personas involucradas en la industria alimentaria deben reconocer la necesidad de vigilancia para controlar los riesgos microbiológicos, a fin de reducir las enfermedades transmitidas a través de los alimentos. Aunque, es improbable que los portadores sean los más importantes como fuente de patógenos (Knabel, 2002).

2.5. MICROORGANISMOS ALTERANTES DE LA CARNE ROJA

Los microorganismos presentes en la carne antes de su almacenamiento son: Micrococcus, Pseudomonas, Moraxella/Acinetobacter, Lactobacillus, Flavobacterium, coreniformes, levaduras, enterobacterias, Staphylococcus, Kurthia, Estreptococos, Bacillus y BrochothrixThermosphacta(Mead, 2007).

Este mismo autor menciona que la carga microbiana depende de la parte de la canal analizada y generalmente la migración microbiana del aparato digestivo hacia la canal no es significativa durante o después del sacrificio aun cuando se empleen en la actividad del faenamiento, cuchillos muy contaminados.

2.5.1. Crecimiento y multiplicación

La mayor parte de las bacterias se reproducen por bipartición, lo que produce una tasa de crecimiento exponencial. Por ejemplo, bajo condiciones óptimas, la bacteria Escherichiacoli se puede dividir una vez cada 20 minutos (Weiss, 2004).

2.6. BACTERIAS ASOCIADAS A LA CARNE DE RES

Para fines de esta investigación, se consideró una las principales Enterobacterias; Escherichiacoli, salmonella, Staphylococcus aureus.

2.6.1. Escherichia coli.

Según las normas NTE INEN 1529-8 es una de las especies bacterianas que a más de presentar las características del grupo coliforme fecal, produce indol a partir del triptófano; es positivo a la prueba del rojo de metilo y negativo a la de voges Proskauer; no utiliza el citrato como única fuente de carbono. Las cepas indol positivas se llaman E.coli Tipo I y se supone que su hábitat natural primario es el intestino. Forma parte de la familia Enterobacteriaceae (Ewing, 1985).

El crecimiento óptimo se consigue a la temperatura de 37.5°C, pero también se desarrolla entre 15-45°C. El pH óptimo es 7, pero tolera amplias oscilaciones. Crece fácilmente en todos los medios corrientes de laboratorio (Merchant & Packer, 1984).

E. coli coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del niño, y establece con el huésped una relación estable de mutuo beneficio (Drasar & Hill, 1974).

E. coli puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal (peritonitis, sepsis, etc.), pero las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas en esta localización (Nataro & Kaper, 1998), que se transmiten por vía fecal-oral de persona a persona o a través del agua y alimentos.

Hay que distinguir varias situaciones patogénicas en las que E. coli desempeña un papel tóxico o invasivo: enteropatógenos (EPEC), enterotoxígenos (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enterohemorrágicas (EHEC) y enteroadherentes (EAEC) (Nicolet., 1985).

2.6.1.1. Escherichia coli enteropatógenos

A mediados de la década de los cuarenta se identificaron en Inglaterra brotes de diarrea en niños de guarderías asociados a E. coli. Las bacterias se

llamaron E. coli Enteropatógenos (EPEC) para diferenciar a este tipo virulento de las bacterias de flora normal (Levine, 1978).

Una de las principales características de la infección es la diarrea de tipo acuoso, que puede ocurrir en diversos grados de intensidad. Además, es común que los niños infectados presenten vómito y fiebre. El periodo de incubación varía de 3 a 24 horas después de que el individuo ingiere en condiciones experimentales un inóculo grande de bacterias (10^9 a 10^{10} UFC); se cree que el inóculo que infecta de manera natural a los niños es mucho menor (Cravioto A, 1988).

Donnenberg, (1997) menciona que una vez que la bacteria alcanza la mucosa intestinal, comienza a desencadenarse un mecanismo de patogenicidad complejo, que tiene como resultado la producción de diarrea. Los niños menores de dos años son la población infantil con mayor susceptibilidad a la infección, y de ellos, la mayor prevalencia se ha observado en lactantes hasta de seis meses.

De manera alarmante, las cifras de letalidad en países subdesarrollados son elevadas (20 a 50%), lo que convierte a la infección por EPEC en una anomalía clínica de inmediata respuesta. Además, se ha notificado en algunos países latinoamericanos que la infección por EPEC supera a la provocada por *Campylobactespp.* Y rotavirus en la población infantil (Cravioto A, 1988)

2.6.1.2. E.coli entero toxígenos

Chavez *et. al.* (2007), conceptúa que la *Escherichia coli* enterotoxigénica (etc) es la causante de la diarrea del viajero, o diarrea acuosa, tanto en niños como en adultos. Su transmisión se relaciona con el consumo de alimentos contaminados y mal cocinados, lo que provoca brotes epidemiológicos en México con este tipo hasta en 70% de los casos. El mecanismo de patogenicidad de ETEC implica factores de colonización, producción

adhesinas y enterotoxinas, como It y/o ST, y la fimbria longus. El Laboratorio de Patogenicidad Microbiana de la BUAP cuenta con 156 cepas de E. coli aisladas de diferentes ambientes y muestras clínicas de la ciudad de Puebla.

2.6.1.3. E. coli entero invasivas.

El grupo EIEC y Shigellaspp están relacionados genética y bioquímicamente ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas. El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes (Nataro & Kaper, 1998).

Snyder (1984), menciona que los síntomas característicos en persona infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos solo presentan diarrea, esta en ocasiones es indistinguible de la que produce ETEC. Las cepas EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses.

2.6.1.4. E.coli enterohemorrágicas.

La ECEH produce una toxina denominada Shiga, característica de la bacteria, que ocasiona cuadros de diarrea, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica (PTT). E. coli O157:H7 es el prototipo de un grupo de más de 150 serotipos de E. coli que comparten el mismo potencial patogénico (Malbran, 1998).

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) fue descrito por primera vez por Knowlchuk en 1977, quien informó que cepas de E. coli de los serogrupos O18, O26, O111 y O128 aisladas de niños con diarrea y de cerdos con edema de pulmón producían una toxina a la que se denominó

Verotoxina, debido al efecto citotóxico en células Vero. Pocos años después se aislaron cepas de *E. coli* que producían un efecto citotóxico en células HeLa, el cual podía ser neutralizado por un antisuero anti-toxina Shiga de *Shigelladysenteriae* tipo (O'Brien *et al*, 1982). por lo cual se las llamó "Shiga – like toxin". En 1982, en Michigan y Oregon se produjo un brote de CH causado por el consumo de hamburguesas, identificándose por primera vez el serotipo de *E. coli* O157:H7 como patógeno humano (Riley *et al*, 1983).

2.6.1.5. E. Coli enteroadherentes.

Comprende algunos serotipos enteropatogenos, que no ortan plasmidos para el factor de adherencia <EAE> que tienen las cepas ECEP, pero capaces de adherirse a celulas Hep- 2, ni elaboran enterotoxinas ni verotoxinas ni invaden las celulas epiteliales. Cravioto y cols. Han sido los unicos autores que aislaron en brotes diarreicos, 17 cepas de las que solo dos pertenecian al mismo sero grupo "06" que eran adherentes (ECEA) que no pertenecian a serotipos de ECEP. Theewson y cols.(1980) encontraron la *E. Coli* enteroadherente en el 6% como unico patogeno y en el 2,8% asociado a otros patogenos en 161 adultos estadounidense con diarrea, que habian viajado a Guadalajara (Mexico). La ECEA podria constituir un nuevo mecanismo patogenico de la *E. coli*. Son adherentes al epitelio, las cepas que causan enteritis en los cochinitos al parecer por su antígeno proteico capsular, el K88 cuya perdida impide la enteritis, siendo posible que exista otra semejante en las cepas humana.

2.6.2. Salmonella

Según las normas NTE INEN 1529-15:96 Genero perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, está integrado por microorganismos que conforma colonias típicas sobre medios selectivos sólidos y poseen características bioquímicas y serologías definidas. Generalmente son móviles, Gram negativas, fermentan la glucosa con formación de gas y no fermentan la lactosa.

Este género bacteriano se divide en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* (Grupo V) (Corburn *et al*, 2007),(Ellermeier & Slauch, 2006). *Salmonella* entérica se subdivide en 6 subespecies como se observa en el cuadro 2 que se presenta a continuación:

Tabla 2: Sub especie de *Salmonella* entérica.

Salmonella Entérica	S. entericasubspenterica (Subespecies I)
	S. entericasubspsalamee (Subespecies II)
	S. entericasubsparizoanae (Subespecies IIIa)
	S. entericasubsp. diarizonae (subespecies IIIb)
	S. entericasubsp. houtenae (subespecies IV)
	S. entericasubsp indica (subespecies VI)

Fuente: (Agasan *et al*, 2002).

Muchos aislamientos de humanos y animales de sangre caliente se relacionan con la subespecie I: *Salmonella enterica* sub *enterica*; el 99% de las salmonelosis se relacionan con este grupo (Ellermeier & Slauch, 2006), otras subespecies de *Salmonella enterica* y *S. bongori* se encuentran en el medio ambiente y en animales de sangre fría (siendo de especial interés los reptiles). En general se estima que tienen una menor virulencia, pero estudios recientes han señalado nuevos serovares responsables de brotes (Quirós *et al*, 2007).

Debido a la diversidad de los serovares identificados, la Organización Mundial de la Salud (OMS) han propuesto una clasificación basada en las

combinaciones de los antígenos que posee somático (O), flagelar (H) y capsular (K), este sistema se conoce como el Kauffman-White (Braden *et al.*, 2007).

Braden *et al.* (2007) menciona que los serovares de *Salmonella enterica* son normalmente escritos por su nombre corto, el cual incluye el nombre del serovar, por ejemplo, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium se denota como *S. Typhimurium*. Adicionalmente, los subtipos son útiles para conocer la distribución geográfica de este microorganismo y estos se realizan mediante fagos específicos. Esta clasificación se escribe con números de fagotipo (PT) o fagotipo definitivo (DT). Los dos términos son intercambiables en la literatura y pueden usarse indistintamente.

Salmonella Typhi y *Salmonella Paratyphi* son serovares responsables de causar fiebres entéricas (denominadas fiebre tifoidea y fiebre paratifoidea respectivamente), estos serovares se han adaptado a los tejidos humanos, difieren sustancialmente de los otros serovares en su ecología, por lo que no se incluyen en este perfil (Pokharel, 2006).

2.6.2.1. Crecimiento

La temperatura y tiempo son dos factores que influyen de forma determinante en la aparición de salmonella. En el caso de la temperatura, los extremos no le favorecen: el frío ralentiza su crecimiento, la congelación lo detiene y el calor a partir de 70° C la destruye. Para evitar que esto suceda es muy importante no romper la cadena del frío, congelar rápidamente el alimento y dar especial atención a los tratamientos culinarios sin calor consumidos en frío, especialmente si además se elaboran con alimentos en frío como la mayonesa o las natillas (Eroski, 2008).

En cuanto al tiempo, en un sustrato adecuado y en condiciones favorables de temperatura, las salmonellas duplican su cantidad en pocos minutos. Normalmente la contaminación inicial de los alimentos no es suficiente para desarrollar la infección, el potencial riesgo real aparece con su rápida

multiplicación. Algunas de las principales precauciones incluyen no prolongar excesivamente el almacenamiento de alimentos perecederos y nunca a temperaturas templadas, así como consumirlos nada más cocinarlos. De no ser así, deben mantenerse bien calientes o refrigerados hasta su consumo, que deberá ser lo antes posible. Si no se prevé un consumo inmediato, deberán congelarse rápidamente (Eroski, 2008).

2.6.2.2. Sobrevivencia

Se sabe que *Salmonella* crece bien en alimentos (especialmente si tiene un alto contenido de proteína como el pollo y el huevo), así como en superficies de la industria de alimentos. La habilidad de *Salmonella* para sobrevivir en la cadena agroalimentaria se debe en parte a su capacidad para responder efectivamente a los cambios medioambientales (Humphrey, 2004).

2.6.2.3. Inactivación

Jay *et.al.* (2005), manifiesta que la muerte de la *Salmonella* puede presentarse en los procesos de congelación, pero puede permanecer viable durante este proceso, por lo que debe tenerse en cuenta que la congelación no garantiza su muerte

2.6.3. Staphylococcus aureus

Según las normas NTE INEN 1 529-14:98 Especie bacteriana perteneciente a la familia Micrococcaceae y al género *Staphylococcus*, cuyos miembros tienen la forma de cocos que generalmente se agrupan formando racimos, inmóviles, Gram positivos, aerobios y anaerobios facultativos, temperatura óptima 37°C. Producen un pigmento amarillo dorado, son halotolerantes. Poseen las enzimas coagulasa, fosfatasa y desoxirribonucleasa que le distinguen de otros estafilococos. Producen exotoxinas: hemolisina y enterotoxina.

Hurtado *et. al.* (2002) conceptúa que puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas

relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria.

Este mismo autor sostiene que en la actualidad, este microorganismo se encuentra como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los animales y personas, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado o incluso con otro paciente.

2.6.3.1. Epidemiología

Los seres humanos son un reservorio natural de *S. aureus*. Entre el 30 y el 50% de los adultos sanos están colonizados, y entre el 10 y el 20% se mantienen colonizados persistentemente (Hurtado, 2002). Esta bacteria forma parte de la microbiota normal del ser humano y tiene colonización selectiva de narinas (20-40, en adultos), pliegues intertriginosos, perineo, axilas y vaginas, no obstante, las personas colonizadas tienen un riesgo mayor de sufrir infecciones (Weinkeet *al*, 1992).

La colonización por *S. aureus* se da preferentemente en:

- Personas con diabetes tipo 1;7
- Usuarios de drogas intravenosas
- Pacientes con hemodialisis
- Pacientes quirúrgicos
- Personas con SIDA

2.7. IMPORTANCIA DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS

FAO, (1997) Tradicionalmente las agencias gubernamentales y la industria alimentaria han utilizado tres métodos principales para el control de los microorganismos en los alimentos según enumera la Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos ICMSF (1988). Estos son: (a) educación y formación, (b) inspección de las instalaciones y actividades y (c) ensayos microbiológicos. Estos programas se han dirigido hacia el desarrollo del conocimiento de las causas y consecuencias de la contaminación microbiana, y a la evaluación de las instalaciones, procedimientos y cumplimiento de las buenas prácticas de manipulación. Aunque éstas son partes esenciales en cualquier programa de control alimentario, tienen ciertas limitaciones y defectos.

2.7.1. Control Microbiológico de la carne

Valdiviezo (2010), menciona que la carne tiene un elevado número de microorganismos, como consecuencia de haber estado en contacto con el aire, agua y utensilios y manos del operador durante la manipulación propia del proceso de sacrificio, en la preparación de la canal, en el despiece y en el almacenamiento y transporte.

Las necesidades de un control microbiológico en todas las fases del proceso de transformación se hacen indispensables por razones tan lógicas como pueden ser la seguridad de que los productos industrializados destinados a la alimentación humana que poseen una calidad higiénica y sanitaria satisfactoria (Valdiviezo, 2010).

Entre los medios de cultivos y diluyentes para el análisis microbiológico de Mesofilos aerobios, Salmonella, Staphylococcus aureus y Coliformes fecales. a utilizarse están:

Tabla 3: Medios de cultivos a utilizar para los análisis microbiológicos

MICROORGANISMOS	MEDIOS DE CULTIVOS
<i>Mesofilos Aeroibios</i>	Agua Peptonada Standard Methods Agar
<i>Staphylococcus Aureus</i>	Agua Peptonada Baird Parker Agar
<i>Salamonella</i>	Agua PeptonadaBuferada Caldo Tetratoniato Caldo RappaportVassiliadis Agar Nutritivo XLD Agar Triple SugarIron Agar Medio Sim
<i>Coliformes Fecales</i>	Agua peptonadaBuferada Agar Levine Brilliant Green BileLactoseBroth (bglb) Agar nutritivo

Fuente: NTE INEN 1529-8, 1529-5, 1529-15,768.

2.7.2. Requisitos microbiológicos de la carne bovina en el Ecuador.

Según la normativa ecuatoriana aplicable a los productos cárnicos crudos, los productos cárnicos curados –madurados, los productos cárnicos precocidos - cocidos a nivel de expendio y consumo final; establece los requisitos microbiológicos para los productos cárnicos crudos, los cuales se presentan a continuación:

Tabla 4: Requisitos microbiológicos que debe cumplir la carne bovina en el Ecuador

REQUISITO	N	c	M	M	MÉTODO DE ENSAYO
Aerobios mesófilos ufc/g*	5	3	1.0x10 ⁵	1.0x10 ⁷	NTE INEN 1529-5
Escherichiacoli ufc/g*	5	2	1.0x10 ²	1.0x10 ³	AOAC991.14
Staphylococcus aureus ufc/g*	5	2	1.0x10 ³	1.0x10 ⁴	NTE INEN 1529-14
Salmonella ¹ / 25 g**	5	0	Ausencia		NTE INEN 1529-15

Fuente: NTE INEN 1338-2012: 3^a. REVISIÓN

¹ Especies serotipificadas como peligrosas para humanos

* Requisitos para determinar término de vida útil

** Requisitos para determinar inocuidad del producto

Donde:

n= Número de unidades de la muestra

c= Número de unidades defectuosas que se acepta

m= Nivel de aceptación

M= Nivel de rechazo

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1. Recursos humanos

- Estudiante Investigador
- Asesores de estudio

3.1.2. Recursos de laboratorio

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

3.1.3. Recursos Biológicos

- Muestras de carnes

3.1.4. Recursos Químicos

- Medios de cultivo
- Reactivos

3.1.5. Recursos Físicos

- Equipos de oficina (Computadora, papel bond, impresora, pendrive.)
- Vehículo
- Laboratorio de microbiología

3.1.6. Localización del experimento.

Esta investigación se la realizo en el cantón Buena Fé perteneciente a la Provincia de los Ríos ubicada a una altura de 100 m.s.n.m. registrando una población de 63.148 Hab. según el último Censo poblacional y vivienda (2011).

Tabla 5: Límites Geográficos del Cantón Buena fe.

Norte	Provincia de Santo Domingo
Sur	Cantón Quevedo
Este	Cantón Valencia
Oeste	Provincia de Manabí

Fuente: INAMHI

Tabla 6: Coordenadas geográficas del Cantón Buena fe.

LATITUD SUR	LATITUD OESTE
NORTE: 0° 31' 39"	79° 27' 53"
SUR: 0° 57' 24"	79° 27' 02"
ESTE: 0° 39' 18"	79° 36' 21"

Fuente: INAMHI

Tabla 7: Registró meteorológicos promedio del cantón Buena fe.

Precipitación	85-90% / 10-15%
(época lluviosa/seca)	
Temperatura media.(°C)	12,9 °C a 24,9 °C
Nubosidad (octavos)	7/8
Velocidad del viento (al año)	30 km/h

Fuente: INAMHI

3.1.7. Identificación

3.1.7.1. Variables

En la investigación se plantean dos variables

- **Variable independiente:** Contaminación Microbiológica
- **Variable dependiente:** Calidad Sanitaria e Higiénica de la carne

3.1.8. Tipo y diseño de la investigación

La presente investigación corresponde a una metodología descriptiva, inductiva, deductiva, apoyado por una exploración de datos obtenidos mediante muestreo, dichas muestras de carne que se solicitaron en cada expendio fue de aproximadamente 100 gramos que luego se colocaron en bolsas plásticas debidamente identificadas las cuales fueron trasladadas en hilera al laboratorio de microbiología perteneciente a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, para su posterior procesamiento y lo que respecta a la información microbiológica se obtuvieron los datos mediante siembra en medio de cultivo selectivos y específicos.

3.1.9. Población, muestra o grupo de estudio

Se seleccionó una muestra de 15 elementos de un universo conformado por 19 tercenas registradas en las dependencias municipales del cantón Buena Fé. Para el cálculo del tamaño de la muestra se aplicó la fórmula de muestreo para poblaciones menores a 30 individuos:

FORMULA:

$$n = \frac{N * Z^2 * pq}{d^2(N - 1)Z^2pq}$$

N= Tamaño de la población

n= tamaño muestra

Z_α= 1.96 (nivel de confianza 95%) desviación estándar

$p =$ proporción esperada ($5\% \approx 0.05$)

$q = 1 - p$ ($1 - 0.05 = 0.95$)

$d =$ Precisión ($5\% \approx 0.05$)

Se trabajó con el método de muestreo aleatorio simple. Los resultados se presentaron en cuadros de frecuencias. Las lecturas de crecimiento bacteriano se presentaron en UFC/g o UFC/ml (mesófilos aerobios totales), ausencia/presencia de *Salmonella spp.*, NMP (número más probable) para *Escherichiacoli* y UFC/g ó UFC/ml para Coliformes fecales. Para la comparación de medias en el caso de los mesofilos aerobios se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

Las muestras de carne obtenidas en cada local bajo observación fue de 200g. ± 10 , las cuales fueron colocadas en bolsas plásticas ziplock debidamente identificadas las cuales fueron trasladadas en hielera al laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, para su inmediato procesamiento.

Los medios de cultivo fueron selectivos y específicos para cada determinación; asimismo se aplicó los procedimientos de recolección y transporte de muestras indicados en las normas técnicas ecuatorianas para mesófilos aerobios la NTE INEN 1529-5:2006, NTE 765 para *Escherichia coli* (coliformes fecales), para el caso de *Salmonella spp.*, se utilizó la NTE INEN 1529-15:2009 y para *Staphylococcus aureus* la NTE INEN 1529 14:98

3.1.10. Técnicas de levantamiento de información y procedimientos analíticos

Adicionalmente, se elaboró y empleó un cuestionario debidamente estructurado con preguntas cerradas, dicotómicas y de opción múltiple para levantar información a todos los propietarios/operarios de cada local del registro municipal de tercenas.

3.1.10.1. Determinación de Mesófilos Aerobios (NTE INEN 1529-5:2006)

De cada muestra de 200 g \pm 10g se extrajo 25 g se mezcló con 425 ml de agua peptona en un frasco Erlenmyer de 500 ml de capacidad, se vorteoó y se extrajo 1 ml de la mezcla homogenizada. Se prepararon diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .

Se vertió por duplicado en cada caja Petri 1 ml de cada dilución e inmediatamente, se completó con aproximadamente 20 ml de agar Standard Methods, a una temperatura de $\pm 40^{\circ}\text{C}$, se removi6 en vaivén 5 veces hacia la derecha y 5 hacia la izquierda, se dejó solidificar en la cabina de flujo laminar, se voltearon las cajas y se incubó a 30°C por un tiempo de 48 horas.

Luego se seleccionaron las cajas de dos diluciones consecutivas que presentaron un contaje aproximado entre 15 y 300 colonias, utilizando un contador de colonias se realizó el contaje de las colonias, se anotó el número obtenido con su la dilución respectiva.

Para el cálculo se consideraron los siguientes elementos:

- (n1) Número de cajas de la primera dilución seleccionada
- (n2) Número de cajas de la segunda dilución seleccionada
- (V) Volumen inoculado de cada caja
- (d) Factor de dilución (primera dilución)
- (Σc) Sumatoria de todas las colonias contadas en todas las cajas seleccionadas.

$$N = \frac{\Sigma c}{V(n1 + 0,1n2)d}$$

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

Pre enriquecimiento

Se transfirió 25 gr de carne en un matraz de 1000 ml de capacidad, conteniendo 425 ml de agua peptonada, Se incubo a 37° C durante 24 h.

Luego de este tiempo se extrajo 1 ml de esa mezcla y se colocó 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.

Enriquecimiento

Luego del tiempo de pre enriquecimiento inmediatamente se extrajo con pipeta 1 ml de cada muestra y se sembró 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 incubó a 42°C por 24 horas.

Se extrajo una asada de ambos medios y se inoculó por separado por estrías en tubos de ensayo con agar nutritivo en picos de flauta a 42°C por 24h.

Inoculación en Agares selectivos

Se sacó una asada del medio anterior y se inoculo por estrías en placas Petri contenidas con agar XLD a 37 °C por 24h.

No se observaron colonias sospechosas y por tal motivo no se procedió a sembrar en agar TSI y LIA.

3.1.10.3. Determinación de coliformes fecales

De una mezcla de aproximadamente 50 g de carne se retiró 1 g se mezcló con 9 ml de agua peptonada tamponada buferada y se llevó al vortex luego de procesada se extrajo 1ml de la muestra homogenizada para la respectivas diluciones 10^1 , 10^2 , 10^3 .

Una vez realizada las diluciones con una pipeta estéril, se transfirió 1 ml de las diluciones 10^1 , 10^2 , 10^3 a cada uno de los tubos que contenían 10 ml de

caldo BGBL (Brilliant Green Bilis Lactosa) cada uno con su respectiva campana Durham para a la observación de reacciones positivas a la producción de gas, se incubo a una temperatura 37°C por 48 horas.

Transcurrida las 48 horas se observó la producción de gas en cada dilución para como presunta positiva todos los tubos que presentaron 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 sembró por estrías en placas individuales secas de Agar EMB.

Se invirtió 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 incubaron a 37 °C por 48 horas.

Se observó ennegrecimiento en la mayoría de los tubos contenidos con medio SIM, no hubo producción de gas y movilidad, en el caso de los tubos con agar TSI se observó cambio de coloración y producción de gas en la mayoría de los tubos.

A si mismo se sembró en agar nutritivo a 37 °C por 48 horas al término del cual se le añadió a cada tubo 4 gotas del reactivo de Kovacs y no se observó reacción (anillo de indol) alguna confirmando la ausencia de Escherichiacoli como referente de los coliformes fecales.

3.1.10.4. Detección de recuento Staphylococcus aureus.

De una muestra de aproximadamente 100 g de la cual se extrajo 25 g 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 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 .

Se pipeteo por duplicado en cada caja Petri contenida con 20 mml de agar Bair Parker, 0.25cm^3 de cada dilución.

Se diseminó con la varilla en L, uniformemente, sobre la superficie del agar, hasta que fue absorbido por el medio. Se utilizó una varilla por dilución.

Se invirtieron las placas y se incubaron a 42 °C durante 48 h.

Luego de visualizar las placas, se identificaron colonias diferentes a las de *S. aureus* presuntivos, dando como resultado negativo a dicho estudio.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LA CARNE DE RES

4.1.1. Resultados del nivel de contaminación por microorganismo mesofilos aerobios de en las muestras de carne bovina comercializada en el cantón Buena Fe, 2014

Estos resultados se aprecian en el cuadro 1 seguidamente, en ellas se exponen que las muestras F (9.4), L (4.5), M (9.0) poseen una carga de 10^4 ; las muestras A (5.1), B (4.7), C (6.6), E (1.0), H (9.7), I (8.9) con una carga de 10^5 ; mientras que las muestras con una carga de 10^6 fueron D (1.7), G (1.4), N (1.8), O (1.2).

Cuadro 1: Contaje de Mesófilos aerobios (ufc/g) en las muestras de Carne bovina comercializada en el cantón Buena Fé, 2014

Mesofilos Aerobios Ufc/g	Muestras
10^4	F (9.4) L (4.5) M (9.0)
10^5	A (5.1) B (4.7) C (6.6) E (1.0) H (9.7) I (8.9)
10^6	D (1.7) G (1.4) N (1.8) O (1.2).

Fuente: Investigación realizada por el autor

Al respecto, Aguilar (2013) encontró en un estudio sobre la Calidad microbiológica de la carne de res en dos mercados de la ciudad de Puno, un elevado recuento de bacterias aerobios mesófilos evidenciando malas condiciones sanitarias de las prácticas de beneficio; mientras que Pérez et. al.

(2008), en una investigación que tenía como objetivo conocer la calidad microbiológica de la carne molida de res que se expende en supermercados de la Ciudad de México, los resultados indicaron que en todos los supermercados se encontraron coliformes totales a 30 °C

4.1.2. Conteo de coliformes fecales

Los resultados se presentan abajo en el cuadro 2, en ellos se indica que no existió crecimiento de coliformes fecales en ninguna de las muestras estudiadas, lo que indica un recuento negativo para estos patógenos.

Cuadro 2: Conteo de Coliformes fecales (ufc/g) en las muestras de carne bovina comercializada en el cantón Buena Fé, 2014

Muestras	Promedio Ufc/g
A	Negativo
B	Negativo
C	Negativo
D	Negativo
E	Negativo
F	Negativo
G	Negativo
H	Negativo
I	Negativo
J	Negativo
K	Negativo
L	Negativo
M	Negativo
N	Negativo
O	Negativo

Fuente: Investigación realizada por el autor

Edeza *et. al.* (2012), evaluaron la calidad microbiológica de carne de res en 18 comercios del mercado municipal de Culiacán, Sinaloa, encontrando resultados que demostraron que los niveles de contaminación por parte de este microorganismo se ubicaban dentro de los límites permisibles, por su parte Godínez *et. al.* (2005) evaluaron la calidad microbiológica de la carne en cuatro rastros municipales de Hidalgo, México, notando que los niveles de *E. coli* registrados en dicho estudio representaron un riesgo sanitario para los consumidores.

4.1.3. Determinación de Salmonella spp.

Los resultados se exhiben en la cuadro 3, en ellos se indica la ausencia de la entero bacteria Salmonella spp. En todas las muestras analizadas.

Cuadro 3: Determinación de Salmonella spp. (ufc/g) en las muestras de carne bovina comercializada en el cantón Buena Fé, 2014

Muestras	Promedio Ufc/g
A	Ausencia
B	Ausencia
C	Ausencia
D	Ausencia
E	Ausencia
F	Ausencia
G	Ausencia
H	Ausencia
I	Ausencia
J	Ausencia
K	Ausencia
L	Ausencia
M	Ausencia
N	Ausencia
O	Ausencia

Fuente: Investigación realizada por el autor

Salim *et. al.* (2008), en un estudio que tenía como objetivo detectar salmonella spp por PCR en tiempo real, en canales bovinas, aisló la bacteria en un 1.8% de las muestras tomadas en el matadero de Montería, por su parte Vanegas *et. al.* (2011) presentaron una investigación que tenía como objetivo evaluar el efecto de metabolitos solubles en el extracto crudo de LAC 231 sobre la microbiota presente en la carne de res empacada en atmósfera, donde la carne no presentó contaminación de este patógeno.

4.1.4. Determinación de *Staphylococcus aureus*

Los resultados se exhiben en la cuadro 4, en ellos se indican que la determinación fue negativa para esta bacteria en todas las muestras analizadas.

Cuadro 4: Determinación de *Staphylococcus aureus* (ufc/g) en las muestras de carne bovina comercializada en el cantón Buena Fé, 2014

Muestras	Promedio Ufc/g
A	Negativo
B	Negativo
C	Negativo
D	Negativo
E	Negativo
F	Negativo
G	Negativo
H	Negativo
I	Negativo
J	Negativo
K	Negativo
L	Negativo
M	Negativo
N	Negativo
O	Negativo

Fuente: Investigación realizada por el autor

Arroyo (2008) en un estudio que tenía como objetivo establecer un perfil microbiológico de la carne molida producida localmente y compararla con la importada de los Estados Unidos, no se detectó la presencia de bacteria patógena *Staphylococcus aureus* en las 24 muestras de carne molida analizadas, por su parte Argilagos *et. al.* (2008) en una investigación sobre agentes bacterianos asociados a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en Camagüey, Cuba se identificaron especies capaces de provocar ETA, siendo *S. aureus* el patógeno el predominante, presente en 97 (56,06%) de los casos analizados.

4.1.5. Genero de bacterias circulantes

Finalmente se pudo observar en la mayoría de los materiales sembrados la presencia de bacterias, que de acuerdo a la característica morfológica observada mediante la tinción de gram, nos permiten sospechar que eran del género *flavobacterium* y *bifidobacterium*.

Mateauda (2013) en una investigación que tenía como objetivo evaluar el desarrollo microbiológico en carne bovina envasada al vacío y almacenada al frío, presentaron el 1.5% de genero *flavobacterium spp* en las muestras analizadas al día 0.

4.1.6. Mano de Obra que Laboran en los Negocios Cárnicos del Cantón Buena Fe

Estos resultados se observan en la cuadro 5 más abajo, en ellos se señala que la mayoría de estos negocios (66.66%) ocupan una persona además del propietario en la labores de despiece del producto cárnico, el 20% ocupa de 2-3 personas mientras que el 13.33% tiene más de 3 personas colaborando en su negocio.

Cuadro 5: Personas que laboran en los negocios cárnicos del Cantón Buena fe, 2014

Personas laborando	Frecuencia	%
1	10	66,66
2-3	3	20
>3	2	13,33
Total	15	100,0

Fuente: Elaborado por el autor, 2014

4.1.7. Horarios de atención en los Centros Cárnicos del Cantón Buena fe

En el cuadro 6 se indica que el 86,66% atienden durante todo el día, mientras que el 6,66% lo realizan hasta el mediodía y en la tarde.

Cuadro 6: Horario de atención de los centros cárnicos del Cantón Buena fe, 2014

Resultados	Frecuencia	%
Todo el día	13	86,66
Hasta el medio día	1	6,66
Solo la tarde	1	6,66
Total	15	100,0

Fuente: Elaborado por el autor, 2014

4.1.8. Materia Prima Vendida en los Centros Cárnicos del Cantón Buena fe.

En el cuadro 7, se demuestra la cantidad comercializada en el lugar bajo observación, donde el 53,33% vende una mayor cantidad, es decir, 100 libras en adelante; el 20% expenden entre 51-75; porcentaje similar negocia entre 76-100 libras, mientras que apenas el 6,66% mercadea <50 libras.

Cuadro 7: Cantidad vendida día/libras en los centros cárnicos del Cantón Buena fe, 2014

Resultados	Frecuencia	%
>100	8	53,33
51-75	3	20
76-100	3	20
<50	1	6,66
Total	15	100,0

Fuente: Elaborado por el autor, 2014

4.1.9. Piezas cárnicas que se comercializan en el Cantón Buena fe

En el cuadro 8 se observa el porcentaje de piezas y partes comercializadas en los centros cárnicos. Los resultados revelan que el 66,66% de los comerciantes mercadea piezas menores, el 20% canales completas y menudencias mientras que el 13,33% negocia solo menudencias.

Cuadro 8: Piezas y partes cárnicas comercializadas en los centros cárnicos del Cantón Buena Fe, 2014

Resultados	Frecuencia	%
Solo piezas menores	10	66,66
Canal y menudencias	3	20
Menudencias	2	13,33
Toda la canal s/m	0	0
Total	15	100,0

Fuente: Elaborado por el autor, 2014

4.1.10. Almacenamiento de la Carne en los Centros Cárnicos del Cantón Buena Fe

En el cuadro 9 se muestra el tipo de almacenamiento que posee los locales del comercio, observando que el 80% conservan la carne en congelador, el 13,33% en refrigeradoras a diferencia del 6,66% que conservan la carne en vitrina refrigeradas.

Cuadro 9: Tipo de almacenamiento en los centros cárnicos del Cantón Buena Fe, 2014

Resultados	Frecuencia	%
Congelador	12	80
Refrigeradora	2	13,33
Vitrina Refrigerada	1	6,66
Al ambiente	0	0
Cámara Fria	0	0
Total	15	100,0

Fuente: Elaborado por el autor, 2014

4.1.11. Servicios básicos en los Locales del Comercio del Cantón Buena Fe

Estos resultados se presentan en la Cuadro 10 y en ellos se puede constatar que el 53,33% cumple los requisitos de tener acceso de luz eléctrica a diferencia del 100% que no usa teléfono, el 60% no cumple con los requisitos de tener agua, baño e inodoro mientras que el 53,34% tampoco cumple con los requisitos de usar lavamanos.4

Cuadro 10: Servicios Básicos en los centros cárnicos del Cantón Buena fe, 2014

Resultados	C (%)	Nc (%)
Luz	53,33	46,67
Agua	40	60
Teléfono	0	100
Baño	40	60
Inodoro	40	60
Lavamanos	46,66	53,34
Ninguno	40	60
Todos	6,66	93,34

C= Cumple con el requisito; **NC=** no cumple el requisito

Fuente: Elaborado por el autor, 2014

4.1.12. Material de Limpieza Utilizadas en los Centros Cárnicos del Cantón Buena fe

En el Cuadro 11 se muestra que el 93,33% no cumple con los requisitos de usar jabón como utensilio de limpieza, de igual manera el 86,67 y 66,66% no utilizan detergente y cloro respectivamente, mientras que el 60% utilizan todos los utensilios de limpiezas.

Cuadro 11: Utensilio de limpieza utilizados en los centros cárnicos del cantón Buena fe, 2014

Resultados	C (%)	Nc (%)
Jabón	6,66	93,33
Detergente	33,33	66,66
Cloro	13,33	86,67
Todos	60	40

C= Cumple con el requisito; **NC=** no cumple el requisito

Fuente: Elaborado por el autor, 2014

4.1.13. Formal de Colgamiento de la Carne

En el Cuadro 12, se aprecia que el 66,66% utiliza gancho y tubo para colgar la materia prima, mientras que el 33,33% utiliza varias formas de colgamiento como son tendido, gancho y tubo

Cuadro 12: Forma de colgamiento

Resultados	Frecuencia	%
Gancho y tubo	10	66,66
Ambas formas	5	0
Tendido	0	33,33
Total	15	100,0

Fuente: Elaborado por el autor, 2014

4.1.14. Equipos de Faenamientos que se Utilizan en los Centros Cárnicos del Cantón Buena fe

En el cuadro 13, enseguida, se muestra que el 80% cumple con los requisitos de utilizar C. de Hueso y cuchillo, el 66,66% de usar mesa/trabajo; mientras que el 86,67% no usa hacha, el 73,34% no usa fileteadora y el 100% no cumple con los requisitos de utilizar todos los equipos de faenamiento.

Cuadro 13: Equipo de Faenamiento

Resultados	C (%)	Nc (%)
C.hueso	80	20
Fileteadora	26,66	73,34
Hacha	13,33	86,67
Cuchillo	80	20
Mesa/Trabajo	66,66	33,33
Todas	0	100

C= Cumple con el requisito; **NC=** no cumple el requisito

Fuente: Elaborado por el autor, 2014

4.1.15. Régimen de propiedad de los Centros Cárnicos del Cantón Buena fe

En el cuadro 14 se señala que el 53,33% de los locales de expendios son alquilados, el 3% son locales que se encuentran en las vías públicas, mientras que el 2% son locales propios y de mercado de abastos.

Cuadro 14: Régimen de propiedad del local de expendio

Resultados	Frecuencia	%
Alquilado	8	53,33
Vía publica	3	20
Mercado de abasto	2	13,33
Propio	2	13,33
Total	15	100,0

Fuente: Elaborado por el autor, 2014

4.1.16. Ropa de Trabajo que se Utiliza en los Centros cárnicos del Cantón Buena fe.

En el cuadro 15 se puede apreciar que 53,33% cumple con las normativas de usar mandil; mientras que el 100% no usa cofia, mascarilla y casco y el 66,66% no usa guantes.

Cuadro 15: Indumentaria que se utiliza en los Centros Cárnicos del Cantón Buena Fe, 2014

Resultados	C (%)	Nc (%)
Mandil	53,33	46,67
Guantes	33,33	66,66
Cofia	0	100
Mascara	0	100
Casco	0	100

C= Cumple con el requisito; **NC=** no cumple el requisito

Fuente: Elaborado por el autor, 2014

4.1.17. Característica del local de los centros cárnicos

En el cuadro 16, se muestra que el 100%(3) usa mesón de latón para expender la materia prima.

Cuadro 16: Característica del local

Resultados	Frecuencia	%
Mesón de latón	3	100
Mesón madera	0	0
Mesón cerámica	0	0
Mesón mixto	0	0
Total	15	100,0

Fuente: Elaborado por el autor, 2014

4.1.18. Prueba de Kruskal Wallis

Cuadro 17: Prueba de Kruskal Wallis en microorganismos mesofilos aerobios.

Trat	Media	Rango
10⁴	7.6 a	2.6 a
10⁵	5.43 a	2.33 a
10⁶	1.6 a	1.0 a
H	2.0	

Letras iguales no difieren según Kruskal Wallis ($p < 0.05$)

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- No se detectó la presencia de bacterias patógenas para el ser humano como *Salmonella spp.*, *Escherichiacoli* y *Staphylococcus aureus* asociadas a enfermedades entéricas en humanos lo que relativamente la hacen apta para el consumo. Por lo tanto se acepta la H₀ que dice: **En la carne de bovino que se comercializa en el cantón Buena Fe no se puede diagnosticar uno de los géneros de coliformes fecales que pudieran contaminar las canales en la época de verano del 2014 de acuerdo a las normas NTE INEN-1338-3.**
- La carga de mesófilos aerobios, fue alta en relación con lo permitido por la norma técnica, lo que evidencia una falta de práctica de higiene y salubridad sobre todo en la manipulación, no obstante, debido a que el producto fue sujeto a manipulación durante el transporte se le atribuye una duda razonable al origen de la contaminación, que puede ser en el mismo local o en el vehículo donde se movilizó la carne. Por lo que se rechaza la H₀ que dice: **En la carne de bovino que se comercializa en el cantón Buena fe no se puede determinar la existencia de mesofilos aerobios que pudieran contaminar las canales en la época de verano del 2014 de acuerdo con las normas NTE INEN-1338-3.**
- Los géneros de bacterias circulantes identificadas morfológicamente en la mayoría de las muestras en estudio fueron *Flavobacterium* y *Bifidobacterium*. Ante lo cual, se rechaza la H₀ que dice: **En la carne de bovino que se comercializa en el cantón Buena fe no se puede identificar un género de bacterias de acuerdo con las normas NTE INEN-1338-3.**

5.2. RECOMENDACIONES

- Desarrollar y mantener prácticas higiénicas de lavado de manos, cuchillos, balanzas, ganchos, hachas, chaira y áreas de corte (mesón) con el fin de evitar la fase logarítmica del crecimiento bacteriano.
- Mantener el producto cárnico a baja temperatura para evitar el crecimiento de mesofilos aerobios y alargar la vida útil del producto.
- Realizar análisis microbiológicos al agua utilizada en los centros cárnicos del Cantón Buena fe, para la respectiva limpieza de los productos cárnicos.
- Estudiar el impacto que tienen los medios de transporte y factores externos, sobre la calidad microbiológica de la carne bovina comercializada en el cantón Buena Fe.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

LITERATURA CITADA

- Agasan, K. J. (2002). Ministerio de la Protección Social . Instituto Nacional de Salud. UERIA. 1924-1929.
- Aguilar, S. (16 de Diciembre de 2013). Agro enfoque. Obtenido de <http://agroenf.com/2013/12/16/calidad-microbiologica-de-la-carne-de-res-bos-taurus-en-dos-mercados-de-la-ciudad-de-puno/>
- Aliaga, E. C. (2009). CONTROL DE CALIDAD DE LA CARNE: MÉTODOS Y PROCESO. Lima.
- Argilagos, B., & Cabrera, S. (2008). Agentes bacterianos asociados a brotes de Enfermedades .REDVET.
- Arroyo, N. (2008). *Avalúo Microbiológico de Peligros y Comparación de la Carne Molida de Venta al Detal de Procesadores Locales Estados Unidos*. Recuperado el 10 de Noviembre de 2014, de <http://bovinosparacarne.uprm.edu/publication/arroyollantin%5B1%5D.pdf>
- Braden C, Fields P, Bean N, Tauxe R. CDC. Salmonella Annual Summary 2006. Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Foodborne and Diarrheal Diseases Branch. Atlanta, Georgia 30333.2007. pp 85.
- Cabañas, A. D. (2006). *conservar y congelar nuestros alimentos*. Madrid: Espalsa Calpe.
- Calleja, J. R. (2006). Calidad microbiológica de la carne de conejo y estimacion de la eficacia de algunos tratamientos tecnologicos de conservacion. Leon.
- Caimanque, S. (19 de Septiembre de 2014). Obtenido de http://biblioteca.duoc.cl/bdigital/Documentos_Digitales/600/610/39592.
- Cobbaut K, Berkvens D, houf K, de Deken R, DE Zutter L. Escherichia coli O157 prevalence in different cattle farm types and identification of potential risk factors. J Food Prot 2009; 72:1848-1853
- Corburn, G. S. (2007). Salmonella the host and disease: A brief review. Cell Biol.112-118.

- Cravioto A, Reyes RE, Ortega R, Fernández G, Hernández R, López D. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidemiol Infect* 1988;101(1):123-134
- Donnenberg MS, Kaper JB, Finlay BB. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol* 1997;5(3):109-114.
- Doñate, M. (6 de Junio de 2014). Identificación del origen de la contaminación fecal en aguas con *Bifidobacterium* spp. y/o *Bacteroides* spp. específicas de huéspedes. Obtenido de <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/55275>
- Drasar, B., & Hill, M.(1974). Human intestinal flora. London, Uk,,: Academic Press.
- Edeza, M. J., Quiroz, r. C., & Félix, J. L. (2012). Calidad microbiológica de carne de res comercializada en el mercado municipal de Culiacán, Sinaloa. Scielo.
- Edith Chávez Bravo*, L. E. (2007). Identificación de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas en diferentes ambientes. Scielo.
- Ellermeier, E., & Slauch, J. (2006). The genus salmonella in: *Prokaryotes*. Scielo,123-158.
- Ergonomista, E. (2009). Recursos sobre biología en internet . Recuperado el 22 de Septiembre de 2014, de <http://www.elergonomista.com/alimentos/calidad.htm>
- Eroski. (1 de Octubre de 2008). EroskiConsumer. Obtenido de <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2008/08/11/178939.php>
- Escobar, J. (1975). Zaragoza: Acribia.
- Ewing, W. (1985). Identification of Enterobacteriaceae. Elsevier.
- FAO. (1996). Obtenido de <http://www.fao.org/energy/befs/definitions/es/>

- FAO. (1997). Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. ...
- FAO. (25 de Nov de 2014). Obtenido de <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.html>
- Fernandez, M. (2000). Higiene alimentaria. Recuperado el 20 de Agosto de 2014, de ww.saludalia.com/saludalia /websaludalia/vivir-sano.
- Fernandez, M. (2000). Higiene alimentaria. Recuperado el 20 de Agosto de 2014, de ww.saludalia.com/saludalia /websaludalia/vivir-sano.
- Galvao. (2012). *Oportunidades y desafíos de la producción de alimentos para la salud humana*. Recuperado el Noviembre de 2014, de <http://www.iica.int/Esp/regiones/sur/uruguay/Documentos%20de%201a%20Oficina/CursoBPPPA/Literatura/Venezuela%20Análisis%20Salmonella%20en%20Aves.pdf>
- Gálvez*, A. V., Aravena, E. L., & Mondaca, R. L. (2006). Isotermas de adsorción en harina de maíz (*Zea mays* L.). Scielo, 2.
- García, N. A. (15 de Junio de 2012). MÉTODOS QUÍMICOS PARA LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS. Obtenido de <https://es.scribd.com/doc/97161722/1/ADICION-DE-SUSTANCIAS-CONSERVADORAS>
- Girón, A. L. (2004). Determinación de la carga bacteriana más frecuente en pollo fresco, distribuido en el mercado ciudad real situado en la zona 12 de la ciudad de Guatemala. Guatemala.
- Godínez G., Reyes J.A., Zúñiga A., Sánchez I., Castro, J., Román A.D.,. (2005). Condiciones Microbiológicas en Cuatro Rastros Municipales del Estado de Hidalgo. *Scielo*.
- Gomez, J. A. (Febreri de 2013). *Control y Calidad de Alimentos*. Obtenido de <http://prezi.com/ebazdptw9dyr/untitled-prezi/>
- Gutierrez, J. B. (1988). *Calidad de vida, alimentos y salud humana*. Madrid: Diaz de Santos S.A.
- Gutierrez, J. B. (2000). *Metodos de conservacion de alimentos*. Madrid: Díaz de Santos.

- Gutierrez, Jose Bello. (2005). Calidad de vida, alimentos y salud humana. En J. A. Morales, *Metodos de Conservacion de alimentos*. Madrid: Diaz de Santos S.A.
- Hobbs. (1993). Higiene y toxicología de los alimentos. España: Acribia.
- Humphrey, T. (2004). Salmonella, stress responses and food safet. *Scielo*, 504-509.
- Hurtado, M. d. (2002). Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Scielo*, 112-118.
- Jawets. (1996). *Microbiologia medica*. Mexico: Manual Moderno.
- Jay, L. M. (2005). Food Modern Microbiology. *Scielo*, 619-639.
- Jenkins, C. (Junio de 19 de 2014). *Scribd*. Obtenido de <https://es.scribd.com/doc/212320499/Semana-3>
- Jerez, J. J. (11 de Abril de 2002). *EROSKI CONSUMER*. Obtenido de <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2002/04/02/1425.php>
- Jerez, J. J. (4 de Marzo de 2004). *EROSKI CONSUMER*. Obtenido de <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2004/03/04/11171.php>
- Knabel, S. (2002). *Enfermedades transmitidas a través de los alimentos*:. Recuperado el 21 de Agosto de 2014, de <http://www.worldfoodscience.org/ciencia/hogar.html>.
- Lake, H. A. (2002). profile: Salmonella (non typhoid) in poultry (Whole and . *Scielo*, 62.
- Levine MM, B. E. (1978). scherichia coli strains that cause diarrhoea but do not produce heat-lable or heat enterotoxins and are non-invasive.
- libby, J. (1986). *Higiene de l carne*. Mexico: Continental.
- Malbran, C. (1998). Primer aislamiento de Escherichia coli O157:H7 Enterohemorrágica en el Perú. *Scielo*.

- Martell, A. C. (23 de Febrero de 2014). *NORMATIVIDAD AGROPECUARIA*. Obtenido de <http://www.elsiglodetorreon.com.mx/noticia/965602.normatividad-agropecuaria.html>
- Maria Vanegas Lopez, J. O. (2011). *Bacterias ácido lácticas (bal) como alternativa de conservación de la carne de res empacada en atmósfera modificada*. Obtenido de <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/35>
- Massaguer, H. (Junio de 2011). *INDICADORES DE CALIDAD DE INOCUIDAD DE UN ALIMENTO* . Recuperado el 22 de Septiembre de 2014, de http://www.alimentosecuador.com/descargas/bt4e70d10bd8846_inocuidad.pdf
- Mast. (2014). Obtenido de http://www.mastgrp.com/IFUS/IFU359_SPA.pdf
- Mateauda, J. (2013). Estudio de la microflora bacteriana y cambios físicos químicos en carne bovina envasada al vacío y almacenada en frío . *Scxielo*.
- Mead, G. (2007). Microorganismos alterantes en la carne roja y de aves. En *Análisis microbiológico de carne roja, aves y huevos* (págs. 101-122). Zaragoza: Acribia.
- Mehlhorn, H. (2001). *Cell Multiplication*. Springer.
- Melton-Celsa AR, O. A. (1982). Manual de Procedimientos “Detección de STEC O157 en alimentos”. En G. L. Marta Rivas, *Marta Rivas* (pág. 121).
- Merchant, I., & Packer, R. (1984). *Bacteriología y virologías veterinarias*. España: Acribia.
- Morales, J. A. (2012). *Metodos de conservacion de alimentos*. Mexico: Red Tercer Milenio.
- Nataro, J., & Kaper, J. (1998). Diarrheogenic Escherichia col. *Clin. Microbiol. Rev*, 201.
- Neidhardt, F. (1999). *Cellular and molecular Biology*. Washintong: ASM Press.

- Nicolet., J. (1985). Compendio de bacteriología medica veterinaria. En J. R. Arenillas. España: Acribia.
- NOM-213-SSA1-2002, N. O. (2002). *Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.* Recuperado el 11 de Noviembre de 2014, de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/213ssa102.html>
- *NTC-ISO9000.* (2005). Recuperado el Noviembre de 2014, de SISTEMAS DE GESTIÓN DE LA CALIDAD.FUNDAMENTOS Y VOCABULARIO:http://www.ceicmo.com/resources/documents/NTC_ISO_9000-2005.pdf
- Oscar, T. (2009). Predictive model for survival and growth of Salmonella Typhimurium DT104 on. *Scielo*, 304-314.
- Patiño, A. M. (2009). *Manipulacion e Higiene de los alimentos.* Recuperado el 21 de Agosto de 2014, de <http://alimentosmanipulacion.blogspot.com/2010/01/principios-de-microbiologia.html>
- Perez, M. (2008). Deteccion de microorganismos patogenos e indicadores en carne de bovino que se expenden en supermercados de la ciudad de mexico. *Nacameh*.
- PJ, N., & kraper., J. (1998). Diarrheagenic Escherichia coli. *Clin Microbio*, 142'201.
- Pokharel, K. J. (2006). Ministerio de la Protección Social . Instituto Nacional de Salud . UERIA.
- Quirós F, Z. P. (2007). Perfil de riesgo Salmonella spp. (no tifoideas) en pollo entero y en piezas. 36-38.
- Riley LW, T. R. (1983). En G. L. Martha Rivas, *Manual de Procedimientos "Detección de STEC O157 en alimentos"* (pág. 308). England.
- Salim Máttar, Edna Yanez, Alba Durango. (2008). Determinación de Salmonella spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. *Scielo*.

- Signorin M, L., & Frizzo L, S. (2009). Modelo de contaminación cruzada por *Escherichia coli* verocitotóxigena durante la elaboración de hamburguesas caseras y evaluación cuantitativa de riesgos. *Revista Argentina de microbiología*, 243.
- Snyder JD, W. J. (1984). Características y diagnóstico de grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Scielo*, 281-284.
- Valdiviezo, V. (2010). *Estudio del efecto de diferentes niveles de carragente en la jugosidad de la hamburguesa de carne de res*. Riobamba Obtenido de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1683/1/84T00048.pdf>
- Varnam, A. (1995). *Carne y productos carnicos; Tecnología, química y microbiológica*. España: Acribia
- Velzid. (11 de Julio de 2012). Obtenido de <http://www.gastronomiaycia.com/2012/07/11/diez-errores-que-no-se-deben-cometer-en-la-cocina-de-los-restaurantes/>
- Warris, P. (2003). *Ciencia de la carne*. Zaragoza: Acribia.
- Weinke, T. S. (1992). Association between *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization and septicemia in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 985.
- Weiss, D. (2004). *Bacterial cell division and the septal ring*. Recuperado el 24 de 08 de 2014, de http://es.wikipedia.org/wiki/Fisi%C3%B3n_binaria
- Wood LV, M. J. (1986). Características y diagnóstico de grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Scielo*, 498-500.

ANEXO 1

CUESTIONARIO DESTINADO A LOS COMERCIALIZADORES DE CARNE DE RES

1. Nombre del local:	2. Nombre del propietario:	3. Personas que laboran: a. 1 () b. 2-3 () c. >3 ()
4. Horario de atención: a) Todo el día () b) Hasta el mediodía () c) Sólo la tarde ()	5. Dirección:	6. Cantidad vendida día/Lbs a. < 50 () b. 51-75 () c. 76-100 () d. >100 ()
7. Partes comercializadas a. Toda la canal s/m () b. Sólo piezas menores() c. Canal y Menudencias() d. Menudencias ()	8. Tipo de almacenamiento a) Al ambiente () b) Cámara fría () c) Congelador () d) Refrigeradora () e) Vitrina refrigerada ()	
10. Dónde compra la MP a. Compra animales vivos () b. Compra a mayorista ()	9. Servicios básicos a. Luz () b. Agua () c. Teléfono () d. Baño () e. Inodoro () f. Lavamanos () g. Todo ()	
11. Utensilios de limpieza a) Jabón () b) Detergente() c) Cloro () d) Todos ()	13. Equipo de faenamiento a) C. de hueso () b) Fileteadora () c) Hacha () d) Cuchillo () e) Mesa/trabajo () f) Todas ()	
14. Régimen de propiedad del local de expendio a) Propio () b) Alquilado () c) Mercado de abastos () d) Vía Pública () Si no responde la opción (d) salte a la Preg. 16.	12. Forma de colgamiento a. Gancho y tubo () b. Tendido () c. Ambas formas ()	15. Característica del local a. Meson madera () b. Meson latón () c. Meson cerámica () d. Meson mixto () (sólo si responde a la opción (d) en la pregunta 14)
16. Indumentaria que utiliza a) Mandil () b) Guantes () c) Cofia () d) Mascarillas () e) Casco () f) Ninguna ()		

ANEXO 2

RECOLECCIÓN DE MUESTRA EN LOS DIFERENTES EXPENDIOS DEL CANTÓN BUENA FE



LUGAR: Cantón Buena fe

FUENTE: Quispe, 2014

ANEXO 3

MATERIAL DE VIDRIO ESTERILIZADO



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

FUENTE: Quispe, 2014

ANEXO 4

PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO STANDARD METHODS AGAR PARA LA DETERMINACIÓN DE MESOFILOS AEROBIOS



ANEXO 5

INOCULACIÓN Y HOMOGENIZACIÓN DE LA MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE MESOFILOS AEROBIOS



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

AUTOR: Quispe, 2014

ANEXO 6

INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS A 30 °C PARA LA DETERMINACIÓN DE MESOFILOS AEROBIOS.



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

AUTOR: Quispe, 2014

ANEXO 7

CONTEO DE COLONIAS DE MESOFILOS AEROBIOS



FUENTE: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

AUTOR: Quispe, 2014

ANEXO 8

MUESTRAS DE CARNES EN AGUA PEPTONA INCUBADA A 37 ° C PARA LA DETERMINACIÓN DE SALMONELLA



FUENTE: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

AUTOR: Quispe, 2014

ANEXO 9

TRANSFERENCIA DE 1 ml DE SOLUCIÓN HOMOGENIZADA A AGUA PEPTONA TAMPONADA BUFFERADA PARA LA DETERMINACIÓN DE SALMONELLA



FUENTE: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

AUTOR: Quispe, 2014

ANEXO 10

ENRIQUECIMIENTO DE LA SOLUCIÓN ANTERIOR CON CALDO RAPPAPORT VASSILLIADIS Y TETRATONIATO



FUENTE: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

AUTOR: Quispe, 2014

ANEXO 11

SIEMBRA E INCUBACIÓN EN XLD AGAR



FUENTE: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

AUTOR: Quispe, 2014

ANEXO 12

PESADO Y HOMOGENIZADO DE LA MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES



FUENTE: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

AUTOR: Quispe, 2014

ANEXO 13

TRANSFERENCIA DE 1 ML DE LAS DILUCIONES A CALDO BGBL CON SU RESPECTIVA CAMPANA DURHAM PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES

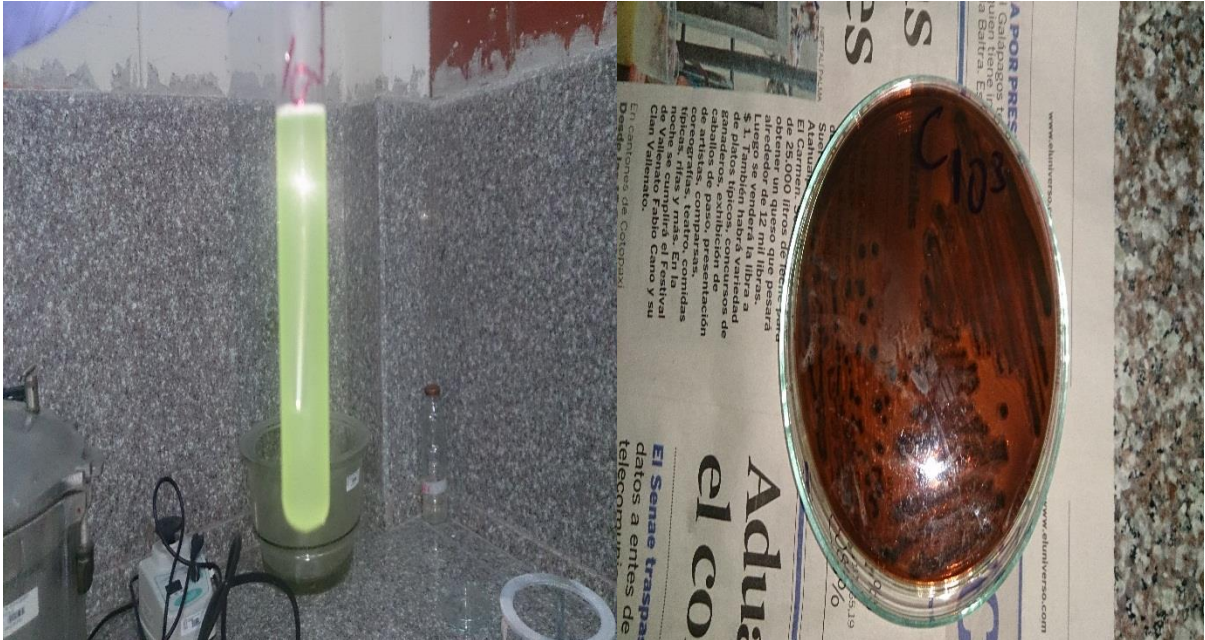


LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

AUTOR: Quispe, 2014

ANEXO 14

TUBOS CON PRODUCCIÓN DE GAS Y SEMBRADO EN AGAR LEVINE RESPECTIVAMENTE



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

AUTOR: Quispe, 2014

ANEXO 15

TUBOS DE ENSAYO CON MEDIOS SIM Y TSI SEMBRADO RESPECTIVAMENTE



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

AUTOR: Quispe, 2014

ANEXO 16

PRUEBA BIOQUÍMICA MEDIANTE EL REACTIVO DE KOVACS

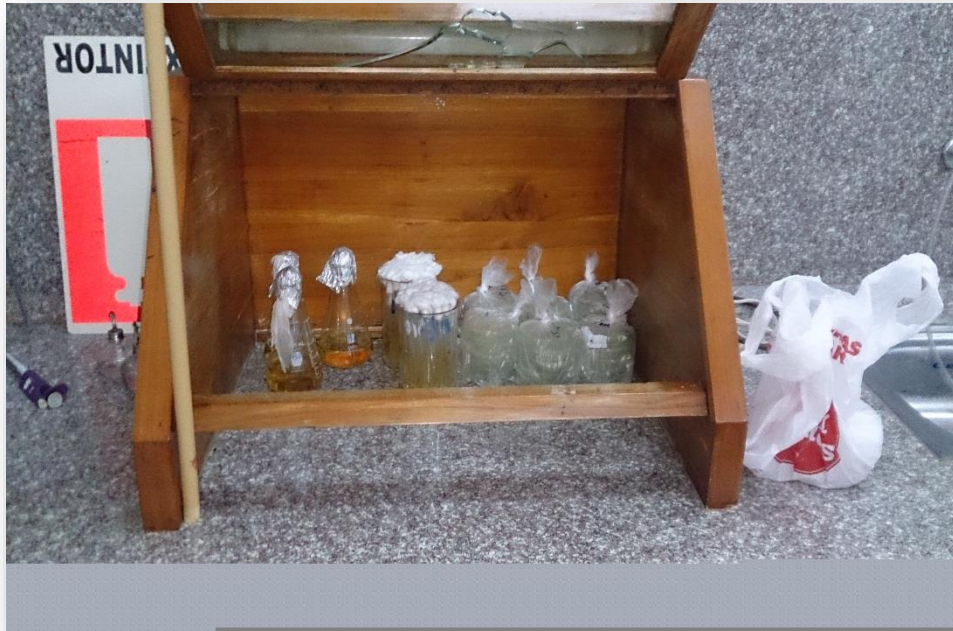


FUENTE: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

AUTOR: Quispe, 2014

ANEXO 17

CAJAS PETRI CON AGAR BAIR PARKER Y ERLLEN MEYER CON AGUA PETONADA



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

AUTOR: Quispe, 2014

ANEXO 18

COLONIAS NEGATIVAS DE S. AUREUS



LUGAR: Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal de Quevedo

AUTOR: Quispe, 2014

ANEXO19

NTE INEN 1529-15:2009



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 1 529-15:96

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS.
SALMONELLA. MÉTODO DE DETECCIÓN**

Primera Edición

MICROBIOLOGICAL CONTROL OF FOODS. SALMONELLA. DETECTION METHOD

First Edition

DESCRIPTORES: Productos alimenticios, análisis microbiológico, determinación de Salmonella
AL 01.05-311
CDU: 614.32:539.67:579.84
CIU: 9320
ICS: 07.100.30

Norma Técnica
Ecuatoriana
Obligatoria

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS.
SALMONELLA. MÉTODO DE DETECCIÓN

NTE INEN
1 529-15:95
1996-01

1. OBJETO

1.1 Esta norma describe el método de ensayo para detectar *Salmonella* en alimentos.

2. ALCANCE

2.1 Este método no es cuantitativo y solo es aplicable para determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* en los alimentos, en general.

3. DEFINICIONES

3.1 **Salmonella.** Género perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Está integrado por microorganismos que forman colonias típicas sobre medios selectivos sólidos y poseen características bioquímicas y serológicas definidas. Generalmente son móviles, Gram negativas, fermentan la glucosa con formación de gas y no fermentan la lactosa.

3.2 **Detección de Salmonella.** Es la determinación de la presencia o ausencia de estos microorganismos en una determinada masa, cuando el ensayo es realizado según el método prescrito.

4. FUNDAMENTO

4.1 Las salmoneras, cuando presentes en los alimentos, generalmente lo están en pequeños números, algunas veces debilitadas y frecuentemente acompañadas de un gran número de otros miembros de *Enterobacteriaceae*, por tanto, en este método se considera las siguientes etapas:

4.1.1 **Pre-enriquecimiento.** Cultivo de la muestra a 37°C en medios mínimos sencillos, exentos de agentes químicos selectivos a fin de lograr la revitalización de las salmonelas lesionadas.

4.1.2 **Enriquecimiento selectivo.** Subcultivo a 37°C y entre 42 a 43°C, en medios líquidos selectivos del cultivo pre-enriquecido, para inhibir o restringir el crecimiento de la flora competitiva y favorecer la multiplicación de las salmonelas.

4.1.3 **Siembra en placa de medios selectivos sólidos.** Inoculación de los cultivos de enriquecimiento selectivo en la superficie de agares selectivos y diferenciales, para visualizar las colonias que por su aspecto característico se las considera como de *Salmonella* presuntiva.

4.1.4 **Identificación.** Subcultivo de las colonias de *Salmonella* presuntiva y determinación de sus características bioquímicas y serológicas para identificarlas como miembros del género *Salmonella*.

(Continúa)

DESCRIPTORES: Productos alimenticios, análisis microbiológico, determinación de *Salmonella*.

5. DISPOSICIONES GENERALES

5.1 El pre-enriquecimiento debe ser utilizado para alimentos que han sido sometidos a tratamientos de conservación: físicos (térmicos, desecación, irradiación); químicos (sal común, curado, ahumado, ácidos y sustancias conservadoras). Los alimentos que no han sido sometidos a tratamiento alguno, o que son altamente contaminados, homogeneizarlos directamente en los medios de enriquecimiento selectivo (8.3).

6. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, EQUIPO Y MATERIAL

6.1 Medios de cultivo y reactivos

6.1.1 *Requisitos básicos.* Para que haya uniformidad en los resultados, es necesario que los componentes de los medios sean de una calidad uniforme y de grado analítico o, a su vez, utilizar medios completos deshidratados, que se los reconstituye según las instrucciones del envase.

6.1.2 *Composición y preparación de los medios de cultivo y reactivos.* Ver NTE INEN 1529-1.

6.1.2.1 Agar bismuto-sulfito (BS)

6.1.2.2 Agar citrato de Simmon

6.1.2.3 Agar cristal-violeta rojo-neutro bilis lactosa

6.1.2.4 Agar fenilalanina

6.1.2.5 Agar hierro lisina (LIA)

6.1.2.6 Agar hierro triple-azúcar (TSI)

6.1.2.7 Agar nutritivo semisólido

6.1.2.8 Agar SS

6.1.2.9 Agar urea o caldo urea

6.1.2.10 Agar verde-brillante rojo-fenol (BG)

6.1.2.11 Agua peptona tamponada

6.1.2.12 Caldo base con púrpura de bromocresol

6.1.2.13 Caldo lisina-descarboxilase

6.1.2.14 Caldo MR-VP

6.1.2.15 Caldo selenito cistina

6.1.2.16 Caldo tetratonato (Muller Kauffmann)

(Continua)

- 6.1.2.17 Caldo Triptona (Ljutov)
- 6.1.2.18 Caldo de soya triptica (TSB)
- 6.1.2.19 Caldo nutritivo
- 6.1.2.20 Leche descremada en polvo
- 6.1.2.21 Solución de gelatinasa al 5%
- 6.1.2.22 Solución de hidróxido de sodio 1 N
- 6.1.2.23 Solución alcohólica de α naftol al 6%
- 6.1.2.24 Solución de ácido clorhídrico 1 N
- 6.1.2.25 Solución de KOH al 40%
- 6.1.2.26 Solución fisiológica
- 6.1.2.27 Solución de creatina al 0,5%
- 6.1.2.28 Solución fisiológica formalizada
- 6.1.2.29 Solución de ONPG (O-nitrofenil β -D-galactopiranosida)
- 6.1.2.30 Solución verde brillante al 1 %
- 6.1.2.31 Reactivo de Kovacs
- 6.1.2.32 Sulfito de potasio en polvo
- 6.1.2.33 Rojo de metilo
- 6.1.2.34 Tergitol aniónico 7
- 6.1.2.35 Tritón X-100
- 6.1.2.36 Antisueros "Vi" y polivalentes "O" y "H".

6.2 Instrumental y vidriería

6.2.1 *Requisitos básicos.* Toda la vidriería y utensilios que se utilicen en los ensayos deben ser de material inerte y resistente a esterilizaciones repetidas, además, deben estar perfectamente limpios y estériles.

6.2.1.1 Molino de carne para laboratorio, provisto de placas crivadas, cuyos agujeros no excedan de 4 mm de diámetro.

6.2.1.2 Licuadora de 8 000 a 45 000 rpm, con vasos de metal o vidrio autoclavables, de capacidad adecuada.

(Continúa)

6.2.1.3 Equipo para esterilizar medios de cultivo y material: autoclave, almohadillas de asbesto, membranas filtrantes, bujías de porosidad adecuada.

6.2.1.4 Estufa de secado, con regulador de temperatura

6.2.1.5 Incubadora, con regulador de temperatura, para cultivos a 37°C

6.2.1.6 Baño de agua, con regulador de temperatura

6.2.1.7 Incubadora o baño de agua para cultivos entre 42 y 43°C

6.2.1.8 Microscopio

6.2.1.9 Refrigeradora

6.2.1.10 Balanza de 0,1 g de sensibilidad

6.2.1.11 Mechero Bunsen

6.2.1.12 Gradillas o tuberías

6.2.1.13 Asas y agujas para cultivos

6.2.1.14 Materiales varios: cucharas, cuchillos, pinzas, tenedores, espátulas, tijeras, saca-bocados, etc.

6.2.1.15 Tubos de ensayo: de 150 mm x 20 mm; 160 mm x 16 mm; 120 mm x 12 mm; 100 mm x 12 mm

6.2.1.16 Probetas graduadas

6.2.1.17 Pipetas bacteriológicas de punta ancha graduadas en 1/10 de cm³

6.2.1.18 Placas Petri de vidrio o desechable de 100 mm x 15mm

6.2.1.19 Erlenmeyer

6.2.1.20 Frascos para muestreo con tapas de rosca, autoclavables

6.2.1.21 Pipetas Pasteur.

7. TOMA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

7.1 La unidad analítica debe provenir de una unidad de muestra de por lo menos 100 g, y se la tomará según la NTE INEN 1529-2. Si el alimento está congelado, a la cantidad necesaria descongelarla durante la noche entre 2 a 5°C ó, a una temperatura menor de 45°C por aproximadamente 15 minutos, de preferencia, en un baño de agua con agitación.

7.2 Las unidades de muestras perecederas que llegan al laboratorio deben mantenerse en refrigeración (2 a 5°C), por no más de 24 h. En general, las muestras se deben mantener en las condiciones adecuadas al producto, hasta el momento del examen.

(Continúa)

8. PROCEDIMIENTO

8.1 Diluyentes. Los líquidos de dilución empleados para el objeto de esta norma son:

8.1.1 Agua peptona tamponada. Para colorantes alimentarios de $\text{pH} > 6$; productos del mar: crustáceos (camarones, cangrejos, etc), moluscos (bivalvos, caracoles), pescados; carnes y productos cárnicos; huevos pasterizados, líquido o en polvo, productos con huevo; gelatinas y postres de gelatina; frutas y vegetales desecados; productos de panadería y pastelería; pastas alimenticias; quesos.

8.1.2 Caldo de soya triptica con 0,5% de K_2SO_3 . Para ajos y cebollas en polvo. El sulfito de potasio se añade al caldo antes de esterilizado.

8.1.3 Caldo de soya triptica. Para especias como, comino, pimienta, páprika, apio, perejil, tomillo, etc, vegetales en hojuelas, levadura seca.

8.1.4 Agua destilada estéril. Para productos desecados con alto contenido en sólidos solubles tales como, leche en polvo, productos desecados para bebés, etc.

8.1.5 Caldo nutritivo. Para productos de repostería.

8.1.6 Leche desnatada en polvo reconstituida. Para caramelos, chocolates y productos de confitería.

8.2 Pre-enriquecimiento. Preparar el homogeneizado con 25g de muestra y 225 cm^3 de diluyente (8.1), y si es necesario, ajustar el pH a $6,8 \pm 0,2$ con una solución estéril de hidróxido de sodio 1N, ó de ácido clorhídrico 1 N, ó de fosfato tripotásico al 8% ($\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

8.2.1 Productos procesados en general

8.2.1.1 Asépticamente, pesar 25 g de la muestra en un frasco de boca ancha con tapa de rosca (500 cm^3), adicionar 225 cm^3 de diluyente, homogeneizar a alta velocidad durante 2 minutos. Si la muestra es pequeña, hacer la dilución proporcionalmente y proceder según el método (informar el resultado en base a la cantidad de muestra realmente analizada).

8.2.1.2 Tapar el frasco y dejar a temperatura ambiente por 60 minutos.

8.2.1.3 Mezclar bien y ajustar el pH. Si la muestra es rica en grasa, después de ajustar el pH, adicionar hasta 2,2 cm^3 de Tergitol Aniónico-7 ó, dos a tres gotas de Tritón X-100, esterilizados a vapor por 15 minutos. Utilizar estos surfactantes en la cantidad mínima necesaria para iniciar la formación de espuma.

8.2.1.4 Con la tapa aflojada 1/4 de vuelta, incubar a 37°C durante no menos 16 horas y no más de 20 horas.

8.2.1.5 Continuar con 8.3.6.

8.2.2 Leche en polvo

8.2.2.1 Pesar asépticamente 25 g de muestra, adicionar 225 cm^3 de agua destilada estéril, tapar, mezclar bien y dejar 60 minutos a temperatura ambiente.

(Continúa)

8.2.2.2 Mezclar y ajustar el pH, adicionar 0,45 cm³ de verde brillante al 1 % y mezclar bien.

8.2.2.3 Con la tapa aflojada 1/4 de vuelta, incubar el frasco mínimo 16 horas y máximo 20 horas a 37 °C.

8.2.2.4 Continuar con 8.3.6.

8.2.3 *Levadura deshidratada*. Utilizando como diluyente caldo de soya trípica, proceder según 8.2.1 y continuar con 8.3.6, excepto que para la levadura deshidratada activa, substituir el caldo de enriquecimiento selenito cistina por el caldo lauril sulfato triptosa.

8.2.4 *Gelatinas*. Pesar asépticamente 25g de muestra, adicionar 225 cm³ de agua peptona tamponada y 5 cm³ de una solución acuosa de gelatinasa al 5,0% esterilizada por filtración y proceder según 8.2.1.2 a 8.2.1.5

8.2.5 *Caramelos, chocolates y productos de confitería*. Pesar 25 g de muestra y añadir 225 cm³ de leche en polvo desnatada reconstituida estéril. Homogeneizar dos minutos a alta velocidad, tapar y dejar 60 minutos a temperatura ambiente. Proceder según 8.2.2.2 a 8.2.2.4 utilizando como agente inhibidor 0,9 cm³ de una solución acuosa de cristal violeta al 1 % ó 0,45 cm³ de verde brillante al 1 %.

8.2.6 *Bivalvos (conchas, almejas, ostiones, ostras)*. Las muestras de moluscos frescos con sus valvas deben mantenerse en ambiente seco, a temperaturas de refrigeración inferiores a 10 °C evitando que entren en contacto con el hielo. A estas muestras, con valvas, y a las desbulladas no congeladas examinarlas dentro de las seis horas a partir de la colecta, en ningún caso se debe examinar muestras que después de la colecta hayan sido guardadas más de 24 h. Las muestras de conchas desbulladas congeladas deben mantenerse en su estado congelado, a temperaturas próximas a la que se encontraban durante la colecta y pueden analizarse tras períodos más prolongados, siempre que se mantengan ininterrumpidamente congeladas.

8.2.6.1 En un recipiente estéril, de boca ancha, de cualquier lote de conchas, desbullar asépticamente 30 conchas sanas.

8.2.6.2 Al azar, subdividir las 30 conchas en dos porciones de 15 conchas cada una, calcular el peso de cada porción y separar dos volúmenes de agua peptona tamponada en cantidad suficiente para obtener una suspensión de 10⁻¹.

8.2.6.3 De cada una de las dos porciones, y dependiendo del peso de cada concha individual, en vasos estériles adecuados para homogeneizar, pesar por separado, alícuotas de aproximadamente 100 g (carne y líquido).

8.2.6.4 Adicionar 300 cm³ de agua peptona tamponada a cada vaso y homogeneizar a alta velocidad durante 90 segundos, adicionar el restante del agua peptona hasta obtener la suspensión madre de 10⁻¹. Mezclar y dejar a temperatura ambiente durante 60 minutos.

8.2.6.5 Mezclar bien por agitación, ajustar el pH.

8.2.6.6 Incubar los dos frascos a 37 °C por no menos 16 h y no más de 20 h.

8.2.6.7 Continuar con 8.3.6.

(Continúa)

8.2.7 Aves

8.2.7.1 Colocar la canal, o trozos de la misma, dentro de una bolsa plástica, adicionar 300 cm³ de agua peptona tamponada y lavarla frotando la superficie de la carcasa durante un minuto.

8.2.7.2 Asépticamente, retirar la canal y transferir el líquido de enjuague a un frasco con tapa. Proceder según 8.2.1.2 a 8.2.1.5.

8.2.7.3 Cuando no se requiere de pre-enriquecimiento, recoger el líquido de enjuague en dos frascos, en volúmenes iguales. Al un frasco añadir igual volumen de caldo tetracionato doble concentración, y al otro, caldo selenito cistina doble concentración. Mezclar bien y dejar 60 minutos a temperatura ambiente.

8.2.7.4 Continuar con 8.3.4 a 8.3.7 teniendo cuidado de mantener la concentración del verde brillante.

8.3 Enriquecimiento selectivo

8.3.1 Tarar dos vasos vacíos estériles del homogeneizador (o sustituto) de aproximadamente 500 cm³ de capacidad. Asépticamente, en cada uno, de las distintas zonas de la unidad de muestra pesar 25 ± 0,1 g (en pequeños pedazos).

8.3.2 Al uno, añadir 225 cm³ de caldo selenito cistina y al otro 225 cm³ de caldo tetracionato sin verde brillante. Sin pérdida de tiempo homogeneizar el alimento a alta velocidad por no más de 2,0 minutos, comenzar con pocas revoluciones hasta llegar entre 15 000 y 20 000 rpm. Omitir la trituración si la muestra es pulverulenta, molida o triturada.

8.3.3 Asépticamente, transferir el homogeneizado a frascos estériles de boca ancha con tapa de rosca (500 cm³) o a otros similares. Dejar 60 minutos a temperatura ambiente.

8.3.4 Mezclar bien y ajustar el pH.

8.3.5 Adicionar 2,25 cm³ de verde brillante al 0,1 % al frasco con caldo tetracionato, mezclar bien.

8.3.6 Cuando la muestra ha sido sometida a pre-enriquecimiento (8.2), entre las 16 y 20 horas de incubación, ajustar la tapa y delicadamente mezclar el cultivo de pre-enriquecimiento, pipetear 10 cm³ en 100 cm³ de caldo tetracionato verde brillante y otros 10 cm³ en 100 cm³ de selenito cistina.

8.3.7 Incubar el caldo selenito cistina a 37 ± 1 °C por 48 horas y el caldo tetracionato entre 42 y 43 °C durante 48 horas.

8.4 Siembra en placa de medios sólidos selectivos y diferenciales

8.4.1 Cuando el período de incubación de los medios tetracionato y selenito alcanza entre las 18 y 24 h, ajustar las tapas y de cada uno de ellos, con asa de cultivo sembrar en estría sobre la superficie seca de placas de agar verde-brillante rojo-fenol (BG), agar *Salmonella-Shigella* (SS), agar bismuto sulfito (BS) de manera a obtener colonias aisladas (primer subcultivo).

8.4.2 Invertir las placas e incubarlas a 37 ± 1 °C por 24 h.

8.4.3 Al término de las 48 horas de incubación de los caldos de enriquecimiento selectivo (8.3.7), de cada uno de ellos, realizar en idéntica forma un segundo subcultivo.

(Continua)

8.4.4 Examinar las placas entre las 20 y 24 horas, si el crecimiento es pobre y no aparecen colonias típicas de salmonelas, examinarlas después de 24 horas más de incubación.

8.4.5 Aspecto de las colonias de *Salmonella* en los medios de agar selectivos

8.4.5.1 Agar verde-brillante rojo-fenol. La mayoría de las colonias típicas de salmonelas son opacas o translúcidas de color rosa o rojo oscuro, y el medio que las rodea varía de rosáceo a rojo. Las colonias típicas pueden presentarse incoloras, otras pueden aparecer de un color verde translúcido cuando están rodeadas por colonias de color verde o verde amarillento de microorganismos fermentadores de la lactosa o sacarosa. Las salmonelas fermentadoras de la lactosa (menos del 1%) presentarán colonias de color verde amarillento o verde.

8.4.5.2 Agar *Salmonella-Shigella*. La mayoría de las colonias típicas de salmonelas son opacas o translúcidas, incoloras o de color crema, con o sin centro negro. Las pocas salmonelas que fermentan la lactosa presentan colonias lisas de color rosa o naranja.

8.4.5.3 Agar bismuto-sulfito. Las colonias típicas tienen el centro negro, borde claro, precipitado negro con brillo metálico alrededor de las colonias ("ojo de conejo", "ojo de pez"). El medio que las rodea es, generalmente, oscuro al principio, tornándose negro a medida que aumenta el período de incubación, produciéndose el llamado efecto halo. Algunas cepas pueden producir colonias verdes con poco o ningún oscurecimiento del medio circundante.

ADVERTENCIA. Cualquier colonia típica o sospechosa debe ser confirmada, ya que reconocer las colonias de *Salmonella* supone mucha experiencia y el aspecto puede variar no solo de especie a especie sino también de lote a lote de medio de cultivo.

8.5 Selección y purificación de las colonias que serán confirmadas

8.5.1 Selección. De cada placa de medio selectivo (8.4) seleccionar 5 colonias típicas o sospechosas bien aisladas y sembrarlas directamente en agar TSI y en LIA (8.6.1). Si en una placa hay menos de cinco colonias típicas, sembrar todas.

8.5.2 Purificación de las colonias elegidas

8.5.2.1 Si en alguna placa, las colonias típicas o sospechosas están contaminadas con colonias de otras enterobacterias, con un asa inocular estas colonias en caldo tetrionato y en caldo selenito - cistina y proceder según 8.3.7 y 8.4.

8.5.2.2 Si en alguna placa no hay colonias bien aisladas, con un asa de cultivo, sin rozar en el agar, tocar solo el centro de la colonia seleccionada y sembrar en estría la superficie seca de placas individuales de agar cristal-violeta rojo-neutro bilis lactosa (ó BG ó, agar MacConkey), de tal manera que se obtengan colonias bien aisladas.

8.5.2.3 Invertir las placas e incubarlas a 37°C por 20 a 24 horas.

8.5.2.4 Elegir colonias incoloras (lactosa negativas), resembrarlas en tubos de agar nutritivo inclinado e incubarlas a 37°C por 20 a 24 horas.

8.5.2.5 Hacer extensiones a partir de los cultivos en agar nutritivo inclinado y teñirlas por el método de Gram. Si se comprueba la pureza de los cultivos, utilizarlos para la confirmación bioquímica y serológica.

(Continúa)

8.6 Confirmación bioquímica

8.6.1 Prueba exploratoria

8.6.1.1 De los cultivos purificados (8.5.2.5) o, directamente de cada una de las colonias típicas (8.5.1), evitando rozar en el agar selectivo, topar con la aguja solo en el centro y superficie de la colonia elegida.

8.6.1.2 Inocular en agar TSI y en agar LIA, inoculando primero un medio y, sin flamear la aguja, inocular el segundo medio de la misma manera. Sembrar por picadura la columna del agar y la superficie inclinada en estría, tapar-los con un tapón flojo. En la columna del agar LIA, hacer dos picaduras (la columna de éste, debe ser de por lo menos 3cm de altura y el sesgo corto).

8.6.1.3 Incubar los tubos de TSI y LIA entre 35 y 37°C por 24 ± 2 horas y 48 ± 2 horas, respectivamente.

8.6.1.4 Examinar conjuntamente los cambios habidos en el TSI y en el LIA e interpretar de la siguiente manera:

Reacciones típicas:

Agar TSI

Agar LIA.

Columna:

Columna:

- Amarilla: reacción ácida, por fermentación de la glucosa
- Burbujas o grietas en el agar: gas a partir de la glucosa (*la S.tiphy* y *S. gallinarum* fermentan sin producción de gas).
- Sin ennegrecimiento: sin producción de H₂S
- Ennegrecimiento: producción de H₂S

- Púrpura: reacción alcalina, por descarboxilación de la lisina
- Ennegrecimiento: producción de H₂S
- Sin ennegrecimiento: sin producción de H₂S.

Lengüeta:

- Roja o inalterada: reacción alcalina, sin fermentación de la lactosa y sacarosa
- Amarilla: reacción ácida por utilización de la lactosa o sacarosa (menos del 1 % de las salmonelas fermentan la lactosa y la lengüeta será amarilla).

8.6.1.5 Purificar los cultivos mixtos en TSI o LIA siguiendo lo indicado en los numerales 8.5.2.

(Continúa)

8.6.2 Pruebas complementarias. A partir de cada cultivo purificado que presenta reacciones de presuntas salmonelas en agar TSI y LIA, realizar las siguientes pruebas:

8.6.2.1 Prueba de la ureasa. Sembrar en estría sobre la superficie de agar urea inclinado (o caldo). Incubar entre 24 y 48 horas a 37°C. La reacción es positiva cuando el color del medio cambia a rosa más intenso o cereza intenso. El medio inalterado indica una reacción negativa. Las salmonelas dan reacción negativa.

8.6.2.2 Prueba de la lisina-decarboxilasa. Inocular en el fondo de la superficie líquida del caldo lisina-decarboxilasa, vedar con vaselina líquida estéril. Incubar 24 horas a 37°C. La reacción es positiva cuando el color del medio es púrpura, el cambio a amarillo indica una reacción negativa. Si el color del medio no es ni púrpura ni amarillo, añadir una o dos gotas de una solución al 0,2% de púrpura de bromocresol y volver a leer. Las salmonelas dan reacción positiva.

8.6.2.3 Prueba de la β galactosidasa

- a) En un tubo estéril hacer una suspensión bacteriana densa con 0,5 cm³ de solución salina estéril, agregar una gota de tolueno y agitar vigorosamente. Incubar el tubo en baño de agua a 37°C por 10 minutos. Añadir 0,25 cm³ de la solución tamponada 0,0133 M de ONPG, agitar e incubar en baño de agua a 37°C por 24 horas. La reacción es positiva cuando aparece un color amarillo, frecuentemente la reacción suele ser apreciable antes de tres horas. Las salmonelas dan reacción negativa.
- b) También se puede utilizar discos impregnados de ONPG que se los añade a la suspensión bacteriana, luego, se agita el tubo delicadamente e incuba de 4 a 6 horas a 35°C.

8.6.2.4 Prueba de Voges-Proskauer

- a) Sembrar en un tubo de caldo glucosa fosfato (caldo MR- VP) el cultivo en análisis, incubar a 37°C por 24 a 48 horas.
- b) Después de este período, añadir los siguientes reactivos cuidando de agitar el tubo después de cada adición:
 - b.1) Solución alcohólica de α naftol al 6%: 3 gotas
 - b.2) Solución de KOH al 40%: 2 gotas
 - b.3) Solución de creatina al 0,5%: 2 gotas (para acelerar la reacción, es opcional).
- c) Leer el resultado después de 4 horas, el color rosa - rojo rubí del medio indica una reacción positiva y es negativa cuando permanece inalterado. Frecuentemente la reacción es apreciable a los 15 minutos. Las salmonelas dan reacción negativa.

8.6.2.5 Prueba del indol. Sembrar en un tubo de agua triptona el cultivo en análisis. Incubar 24 horas a 37°C. Adicionar al tubo 0,2 ó 0,3 cm³ del reactivo de Kovacs. La aparición de un color rojo oscuro en la capa del reactivo indica una reacción positiva, amarillo una reacción negativa. Las salmonelas son indol negativas.

8.6.2.6 Prueba de la fenilalanina-desaminasa. Sembrar en estría sobre la superficie inclinada de agar fenilalanina. Incubar 24 horas a 37°C. Después de este período añadir unas gotas de solución de cloruro férrico 0,5 M. La reacción es positiva cuando aparece un color verde-azulado oscuro. Las salmonelas dan reacción negativa.

(Continúa)

8.6.2.7 Prueba de la utilización del citrato. Sembrar en estría sobre la superficie inclinada de agar citrato de Simmon. Incubar de 24 a 48 horas a 37°C. El cambio del color del medio a un azul fuerte indica una reacción positiva. La mayoría de las salmonelas dan reacción positiva.

8.6.2.8 En la Tabla 1 se resume las características bioquímicas y serológicas de la *Salmonella*. Cualquier cultivo que no haya sido claramente identificado como perteneciente, o no, al género *Salmonella* se debe someter a pruebas bioquímicas adicionales, tales como: pruebas relacionadas con aminoácidos, hidratos de carbono, resistencia al KCN, utilización de fuentes de carbono.

8.7 Confirmación serológica

8.7.1 Para la determinación en porta-objetos de los antígenos "O", "H" y "Vi" de las salmonelas, utilizar cultivos puros de 18 a 24 h en agar nutritivo inclinado, no autoaglutinables, procedentes del crecimiento en TSI y LIA. Por este procedimiento, que a continuación se indica, no es posible la confirmación serológica de las cepas autoaglutinables (se aglutinan espontáneamente en ausencia de antisuero).

8.7.2 Análisis del antígeno somático "O" y capsular "V"

8.7.2.1 Comprobar la eficacia de los antisueros, ensayando el antisuero con cultivos testigos conocidos.

8.7.2.2 Preparar una suspensión densa del microorganismo en análisis, suspendiendo el crecimiento del agar inclinado (8.7.1) en aproximadamente 1 cm³ de solución fisiológica. Tener cuidado para asegurar una suspensión uniforme.

8.7.2.3 En una lámina de vidrio o en la cara interna de una placa Petri de vidrio marcar con un lápiz graso secciones de alrededor 2,5 cm de lado.

8.7.2.4 Poner una gota (0,05 cm³) de la suspensión bacteriana (8.7.2.2) en cada una de dos secciones marcadas, adyacentes.

8.7.2.5 Colocar una gota de solución salina sobre una de las gotas de la suspensión bacteriana. Utilizando un asa de cultivo limpia y estéril, mezclar bien. Es el control negativo de la suspensión bacteriana y no debe aglutinarse. Desechar el cultivo si hay aglutinación.

8.7.2.6 Colocar una gota del antisuero *Salmonella* O poly A sobre la otra gota de la suspensión bacteriana, mezclar bien. Continuar con el poly B.

8.7.2.7 Balancear el porta o la placa Petri, por 1 ó 2 minutos, evitar una evaporación excesiva.

8.7.2.8 Observar la reacción contra un fondo negro, de preferencia con ayuda de una lupa. La aglutinación positiva será rápida y completa. Una aglutinación retrasada o parcial considerarla negativa.

8.7.2.9 Si se obtiene un resultado negativo con poly A o poly B, ensayar con el antisuero *Salmonella* Vi, de la manera indicada.

8.7.2.10 Si el cultivo se aglutina con el antisuero *Salmonella* Vi, calentar la suspensión bacteriana en baño de agua hirviendo durante 10 minutos y enfriar. Una vez fría, volver a ensayarla con el antisuero Vi y con los antisueros O de grupo: D₁, C₁.

(Continúa)

y con los antisueros O de grupo: D₁, C₁.

TABLA 1. Reacciones bioquímicas y serológicas de los miembros del género *Salmonella*.

Prueba o substracto	Positiva	Negativa	Reacción positiva, + o negativa, -	% medio de serotipos que tienen esta reacción (1)
TSI:glucosa-ácido	Columna amarilla	Columna roja	+	100
TSI:glucosa-gas	Burbujas-grietas	Sin burbujas ni grietas	+	91,9
TSI:lactosa-ácido	Lengüeta amarilla	Lengüeta roja	-(a)	99,2
TSI:sacarosa-ácido	Lengüeta amarilla	Lengüeta roja	-	99,5
TSI:H ₂ S	Ennegrecimiento	Sin ennegrecimiento	+	91,6
Ureasa	Color rojo púrpura	Color inalterado	-	100
Decarboxilación de la lisina	Color púrpura	Color amarillo	+	94,6
β-galactosidasa	Color amarillo	Sin cambio	-(a)	98,5
Voges Proskauer	Color rosa a rojo	Color inalterado	-	100
Indol	Anillo púrpura (superficie)	Anillo amarillo	-	98,9
Fenilalanina-desaminasa	Verde-azulado obscuro	Color inalterado	-	100
Utilización de citrato	Crecimiento y color azul	Sin crecimiento y color inalterado.	v	87,1
Suero polivalente "O"	Aglutina	No aglutina	+	100
Suero polivalente "H"	Aglutina	No aglutina	+	100

(1) +, -, indican que las reacciones son positivas o negativas en 1 o 2 días; v, variable. Estos porcentajes solo indican que no todas las cepas de *Salmonella* reaccionan conforme a lo calificado como + ó -. Estos porcentajes pueden variar de país a país y de producto alimenticio a producto alimenticio.

(a) El subgénero III de *Salmonella* (**Arizona**) puede dar reacciones lactosa y β-galactosidasa positivas; el subgénero II de *Salmonella* puede dar una reacción lactosa negativa, pero una reacción β-galactosidasa positiva.

(Continúa)

8.7.2.11 Si el cultivo después de tratado por el calor no reacciona frente al antisuero Vi, pero reacciona con el antisuero O de grupo D₁, probablemente es *Salmonella typhi*, y *Salmonella paratyphi C* si reacciona con el antisuero de grupo C₁. Confirmar estos resultados utilizando sueros monovalentes.

8.7.2.12 Si el cultivo calentado continúa reaccionando con el antisuero Vi, pero no con los antisueros O de grupo, probablemente es un miembro del género *Citrobacter* y no es *Salmonella*. Confirmar este resultado mediante las pruebas bioquímicas, especialmente lisina-descarboxilasa y KCN.

8.7.2.13 Si el cultivo sin tratamiento térmico (8.7.2.9, 8.7.2.10) no se aglutina con el antisuero Vi, ensayar la muestra con los demás antisueros *Salmonella* polivalentes O.

8.7.2.14 Si hay aglutinación con algún antisuero polivalente y se desea identificar el serogrupo al que pertenece, ensayar la muestra según lo indicado, pero utilizando los correspondientes antisueros O de grupo ó monovalentes.

8.7.3 *Análisis del antígeno flagelar "H"*. Utilizar cultivos puros (8.7.1) en agar nutritivo semisólido y ensayar la muestra según 8.7.2, pero utilizando antisueros H polivalentes o de grupo.

8.7.4 *Clasificación de la reacción*

8.7.4.1 *No específica*, cuando hay aglutinación en ambas mezclas. La mezcla suspensión bacteriana x solución fisiológica debe permanecer inalterada.

8.7.4.2 *Positiva*, cuando los microorganismos se aglutinan en presencia de un antisuero. La mezcla suspensión bacteriana x antisuero forma grumos.

8.7.4.3 *Negativa*, cuando en presencia de un antisuero los microorganismos no se aglutinan, permaneciendo inalterada la mezcla suspensión bacteriana x antisuero.

8.7.5 *Interpretación de los resultados*

8.7.5.1 Son consideradas *Salmonella* aquellas cepas que presentan reacciones bioquímicas típicas (tabla 1) y dan reacciones serológicas positivas según 8.7.2 y 8.7.3.

8.7.5.2 Pueden ser *Salmonella* aquellas cepas que presentan reacciones bioquímicas típicas según la tabla 1, pero que no dan reacciones serológicas positivas según 8.7.2 y 8.7.3, cepas que no presentan reacciones bioquímicas típicas, pero dan reacciones serológicas positivas según 8.7.2 y 8.7.3 y las cepas autoaglutinables que dan reacciones bioquímicas típicas.

8.7.5.3 No son consideradas como *Salmonella* las cepas que no presentan reacciones bioquímicas típicas (tabla 1) y reacciones serológicas positivas según 8.7.2 y 8.7.3.

8.7.6 *Confirmación definitiva*

8.7.6.1 Enviar las cepas consideradas como *Salmonella* (8.7.5.1) y las cepas sospechosas de ser *Salmonella* (8.7.5.2) a un Laboratorio de Referencia para *Salmonella* reconocido para que sean definitivamente tipificadas. Este envío debe ir acompañado de toda la información posible de la cepa(s).

(Continúa)

9. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

9.1 Si en ninguna de las placas de agar selectivo sembradas con el cultivo de enriquecimiento selectivo, se desarrolla colonia alguna de *Salmonella*, reportar: "No se aisló *Salmonella* en 25 g (u otra cantidad) de muestra examinada; el medio sólido selectivo secundario fue (SS, bismuto sulfito...)".

9.2 Si a partir de uno, o de ambos medios de enriquecimiento selectivo, se aísla *Salmonella* en las placas de agar selectivo, reportar: "Se aisló *Salmonella* en 25 g (u otra cantidad) de muestra examinada; el medio(s) de enriquecimiento selectivo fue...; el medio(s) sólido selectivo secundario fue...; las pruebas bioquímicas realizadas fueron:...; los antisuecos con que se aglutinó fueron:...; la marca..."

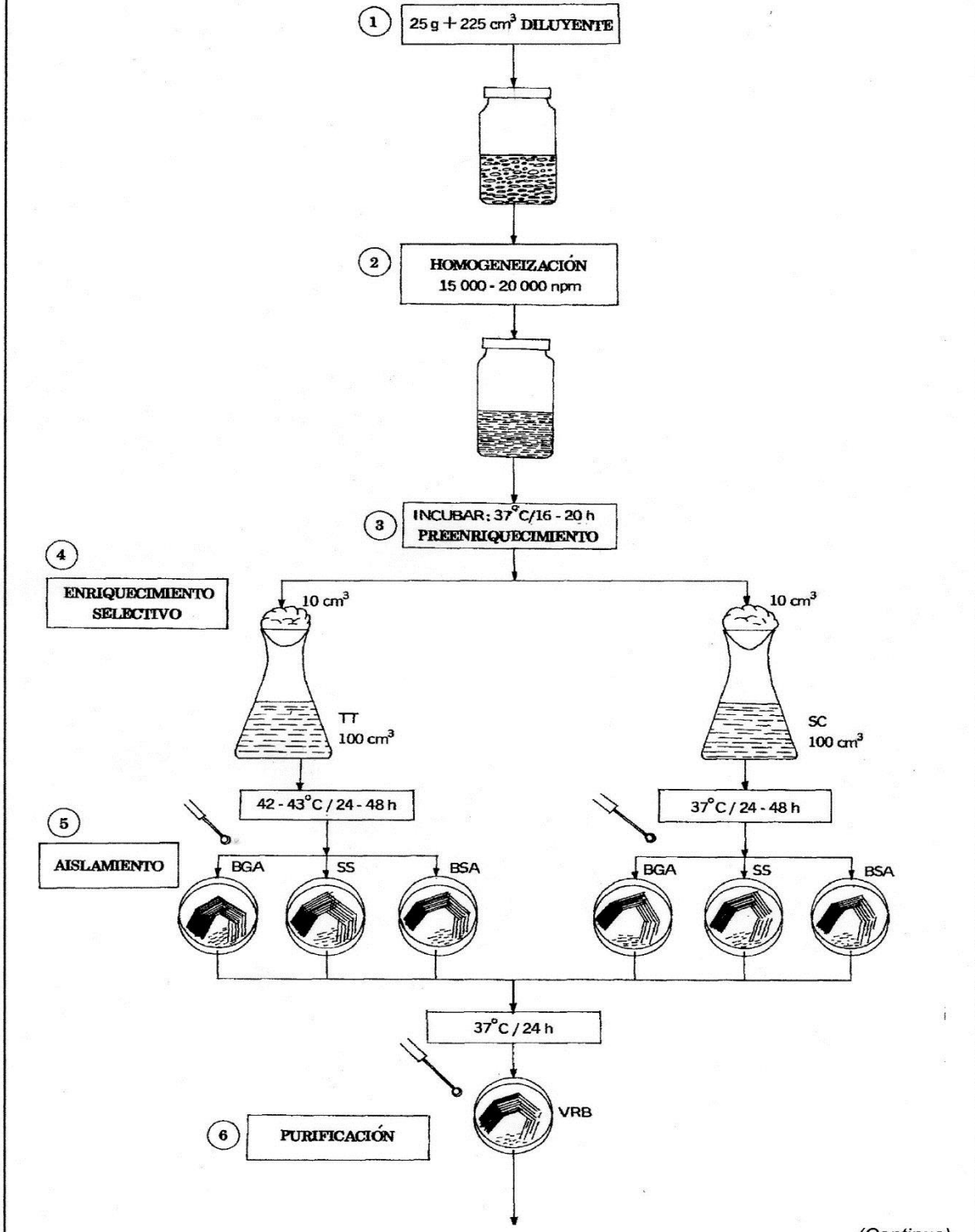
10. INFORME DEL ENSAYO

10.1 En el informe del ensayo reportar el resultado como se indica en el numeral 9. Además, indicar la norma de referencia y el nombre exacto del Centro donde se identificó la cepa.

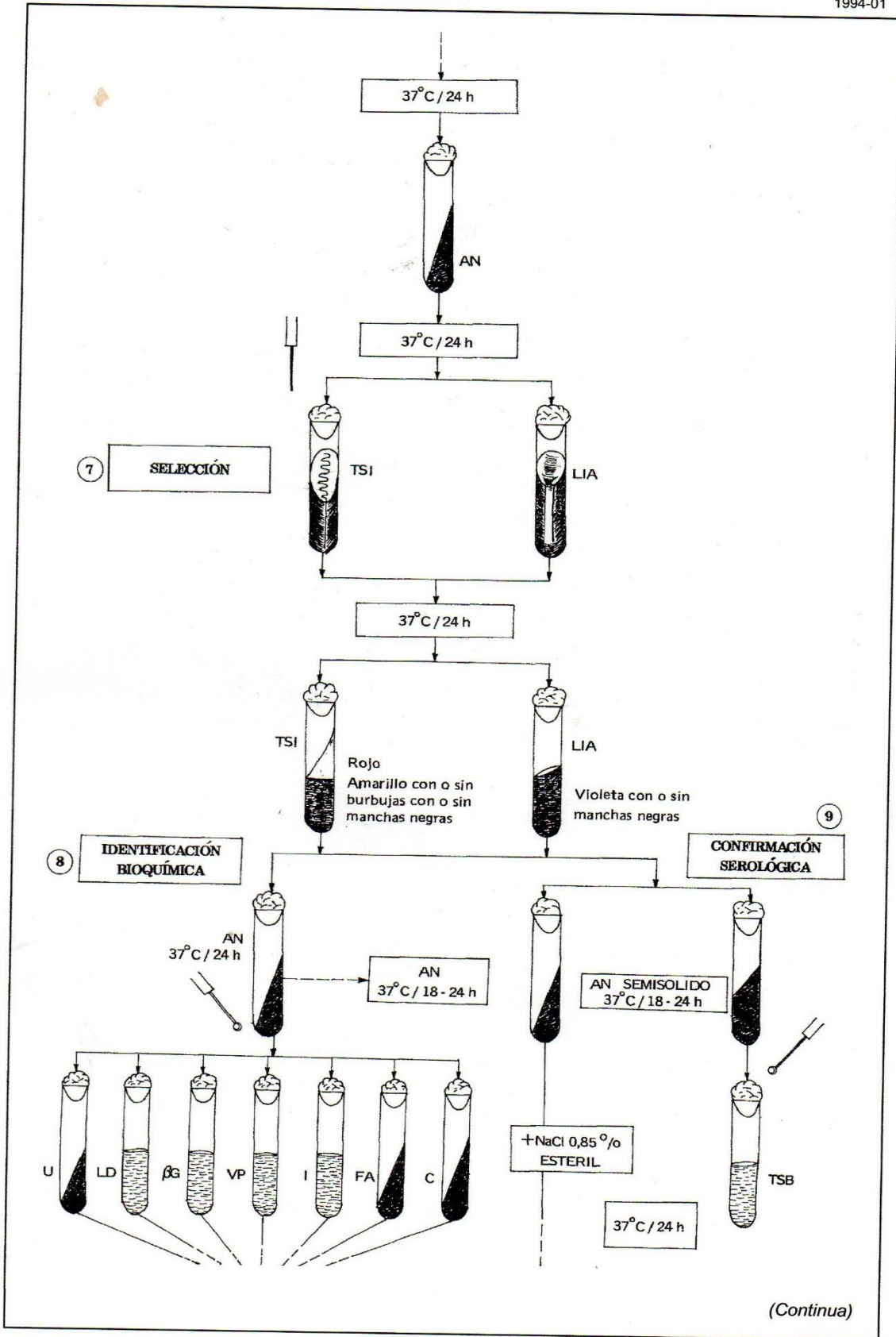
10.2 Indicar cualquier condición no especificada en esta norma o considerada como opcional. El reporte debe incluir todos los detalles necesarios para la completa identificación de la muestra.

(Continúa)

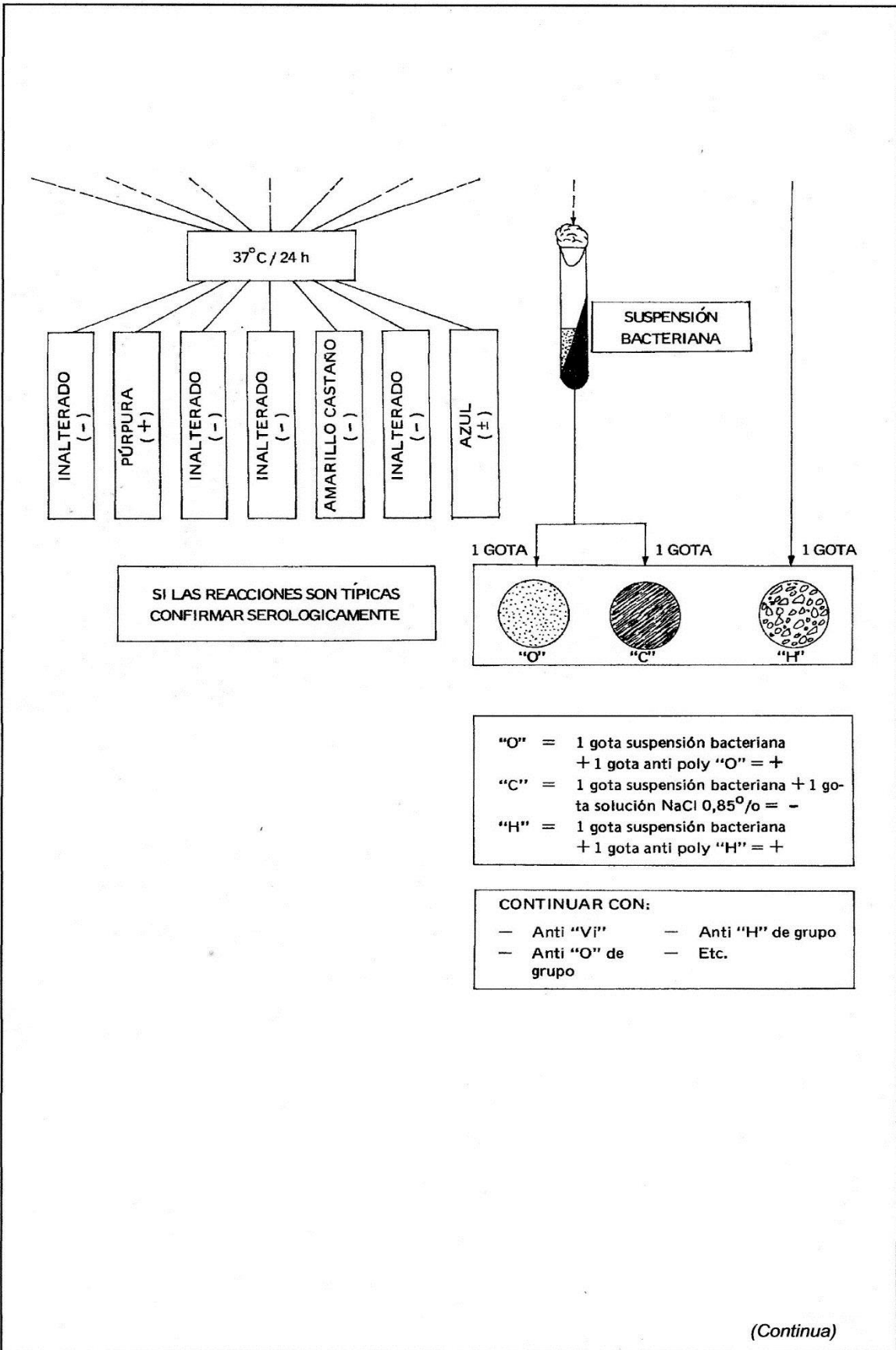
ANEXO A DETECCIÓN DE SALMONELLA



(Continua)



(Continua)



APENDICE Z

Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-1:1995 *Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo.*

Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-2:1995 *Control microbiológico de los alimentos, Toma y preparación de muestras.*

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Norma Internacional ISO 3565-1975 "*Meat and meat products*". *Detection of Salmonellae (Reference method). First Edition.* International Organization for Standardization. Switzerland, 1975.

Manual Food and Drug Administration Bureau of Food Division of Microbiology. "*Bacteriological Analytical Manual*". Fifth Ed. AOAC. Washington, DC 1978.

Manual Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. "*Métodos de Examen Microbiológico para Alimentos y Bebidas*", Normas Recomendadas. Manual Práctico. Madrid, 1976.

Harrigan, W.F., McCance, M. E. "*Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos Lácteos*". Academia. León-España, 1979.

Mossel, D.A.A., Moreno García, B. "*Microbiología de los Alimentos*", 1a. edición española. Acribia. Zaragoza-España.

ICMSF "*Microorganismos de los Alimentos 1*". Técnicas del Análisis Microbiológico. Acribia. Zaragoza-España

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Documento: NTE INEN 1529-15	TÍTULO: CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. SALMONELLA. METODO DE DETECCION	Código: AL 01.05-311
ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio:	REVISIÓN: Fecha de aprobación anterior por Consejo Directivo Oficialización con el Carácter de por Acuerdo No. de publicado en el Registro Oficial No. de Fecha de iniciación del estudio:	

Fechas de consulta pública: de a

Subcomité Técnico: **Control microbiológico de los alimentos**

Fecha de iniciación: 1994-03-07

Fecha de aprobación: 1994-03-07

Integrantes del Subcomité Técnico:

NOMBRES:

INSTITUCIÓN REPRESENTADA:

Dr. Ramiro Gallegos (Presidente)
Ing. Bolívar Cano

SUBDIRECTOR TECNICO, INEN
DIRECCION DE PROTECCION AL
CONSUMIDOR Y DIRECCION DE
NORMALIZACION, INEN
DIRECCION DE VERIFICACION ANALITICA,
INEN

Dra. Hipatia Navas S. (Secretaria Técnica)

Otros trámites:

Reemplaza a las NTE INEN 720 y 764

El Consejo Directivo del INEN aprobó este proyecto de norma en sesión de 1995-10-24

Oficializada como: OBLIGATORIA
Registro Oficial No. 860 de 1996-01-11

Por Acuerdo Ministerial No. 1995-12-26

ANEXO 20

NTE INEN 768



CDU 664.93

AL 03.02-324

Norma Ecuatoriana	CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS. DETECCION Y RECUESTO DE ESTAFILOCOCOS AUREUS (S.AUREUS).	INEN 768
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece el método para detección y recuento de estafilococo áureas, en carne y productos cárnicos.</p> <p style="text-align: center;">2. TERMINOLOGIA</p> <p>2.1 Estafilococo coagulasa positiva. Son microorganismos que forma colonias típicas en los medios selectivos correspondientes y que coagulan el plasma cuando se realiza el ensayo, de acuerdo a lo indicado en esta norma.</p> <p style="text-align: center;">3. FUNDAMENTO</p> <p>3.1 El método se basa en colocar 0,25 cm³ de la muestra homogenizada, y sus diluciones, sobre la superficie de una placa que contiene el medio Baird Parker. El medio contiene sustancias inhibitoras que no interfieren con el crecimiento del estafilococos áureus. Las colonias del estrepto áureus en el medio indicado se presentan de color negro, rodeadas de una zona clara característica debido a la capacidad de reducir el telurito de potasio y de hidrolizar la yema de huevo presente en el medio. El ensayo confirmativo se realiza con la prueba de la coagulasa.</p> <p>3.1.1 Coagulasa, sustancia que coagula al plasma de humanos y animales de sangre caliente.</p> <p>3.2 La detección y recuento del estafilococos áureus requiere las etapas siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none">a) dilución.b) inoculaciónc) incubaciónd) recuento presuntivoe) confirmación. <p style="text-align: center;">4. INSTRUMENTAL</p> <p>4.1 Área de trabajo. Limpia, bien iluminada, libre de corrientes de aire. Mesa nivelada, de superficie amplia y no porosa, desinfectada antes de cada análisis.</p> <p>4.2 Homogenizador, (licuadora). Con recipiente resistente a la esterilización; debe operar mínimo a 15 000 r/min, ni máximo de 20 000 r/min.</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN, Casilla 3999 - Baquerizo 454 y Ave. 6 de Diciembre - Quito-Ecuador - Prohibida la reproducción

4.3 Autoclave

4.4 Incubador, con regulador de temperatura ajustada a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.5 Baño de agua, a 45°C .

4.6 Contador de colonias

4.7 Pipetas graduadas de 1 cm^3 y $0,25\text{ cm}^3$

4.8 Cajas Petri de vidrio o plásticas de 100 mm de diámetro, estériles.

4.9 Gabinete de secado

4.10 Balanza analítica, sensible al 0,1 g

4.11 Botella o matraz Erlenmeyer. De 500 cm^3 y $1\ 000\text{ cm}^3$ de capacidad.

4.12 Varillas de vidrio. Estériles, dobladas en ángulo recto en uno de sus extremos.

5. REACTIVOS

5.1 Agar Baird Parker (Anexo A.1).

5.2 Agar sal yema de huevo (Anexo A.2).

5.3 Agar sal manitol (Anexo A.3).

5.4 Caldo infusión cerebro-corazón (Anexo A.4).

5.5 Caldo tripticasa soya (con glucosa) (Anexo A.5).

5.6 Plasma de conejo (deshidratado), conteniendo 0,1% de EDTA (Anexo A.6).

5.7 Agua peptonada, diluyente (Anexo A.7).

(Continúa)

6. PREPARACION DE LA MUESTRA

6.1 Deberán cumplirse las disposiciones establecidas en la Norma INEN 17.

6.2 La preparación de la muestra se realizará de acuerdo a la Norma INEN 776.

6.3 La toma y preparación de la muestra, a más de responder a lo indicado en 6.2, se realizará en estricta asepsia, con bisturí y pinzas perfectamente esterilizadas.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 La determinación debe efectuarse por duplicado sobre la misma muestra preparada.

7.2 En condiciones asépticas, transferir 25 g de la muestra preparada dentro de un Erlenmeyer (ver 4.11) y agregar 225 cm³ de la solución A.4 (ver Anexo A). Colocar en el homogenizador entre 15 000-20 000 rpm por un tiempo no más de 2,5 minutos (dilución 1:10) (ver Anexo B).

7.3 **Dilución.** De la solución 1:10. Transferir asépticamente a un tubo de ensayo 10 cm³ y de ésta tomar 1 cm³ y colocar en el tubo de ensayo que contendrá 9 cm³ de agua peptonada; obteniéndose por tanto una dilución 1:100; de esta solución, tomar 1 cm³ y transferir a otro tubo que contenga 9 cm³ de agua peptonada y se tendrá una dilución de 1:1 000, y así sucesivamente, se obtendrán diluciones de 1:10 000, del 1:100 000 ó las que fueren necesarias, (ver Anexo B).

7.4 **Inoculación.** De la solución primera y sus diluciones correspondientes, tomar 0,25 cm³ y colocar sobre las cajas Petri (preparadas asépticamente) que contendrán el medio Agar Baird Parker (ver A.1) y repartir uniformemente con una varilla de vidrio estéril. (ver 4.12).

7.5 **Incubación.** Incubar las cajas invirtiéndolas a 37°C por el tiempo de 24h00 y 48h00.

7.6 **Recuento presuntivo** de S. Aureus.

- a) Después de las 24h00 de incubación, seleccionar las cajas con 30 a 300 colonias separadas de color negro y aspecto brillante, con bordes blancos estrechos y rodeados por zonas claras que se extienden en el medio opaco. Estas son colonias presuntivas de S. Aureus.
- b) Anotar la posición de estas colonias y reincubar las cajas por otras 24 h00.
- c) Contar todas las colonias con la apariencia indicada según a), desarrolladas durante el periodo de incubación suministrados por aquellos o en número significativo de ellos para la prueba de la coagulasa.
- d) Colonias de unas pocas cepas de S. Aureus pueden estar rodeadas por una zona opaca a las 24 h00, y un gran número de cepas pueden mostrar este aspecto a las 48h00. Por otro lado, estafilococos coagulasa negativa pueden mostrarse claramente después de las 48h00. Por tanto, la prueba de la coagulasa debe efectuarse con las colonias sospechosas.

(Continúa)

- e) Contaje total de colonias que han producido zonas claras después de las 24h00 de incubación y aquellas que aparecieron luego de las 48h00 y probaron ser coagulasa positiva.

7.7 Confirmación. Ensayo para coagulasa

- a) Transferir las colonias sospechosas *S. Aureus* a tubos que contengan 5 cm³ de infusión cerebro corazón (ver A.2) e incubar por 20h00 - 24h00 a 35° - 37°C. (ver Anexo B).
- b) Agregar 0,1 cm³ del cultivo resultante a 0,3 cm³ de plasma de conejo rehidratado (ver A.3) que está colocado en pequeños tubos e incubar a 35° - 37°C.
- c) Examinar los tubos después de 06h00. La formación de coagulasa indica como ensayo positivo (3⁺). La reacción (4⁺) se obtiene cuando coagula todo el contenido del tubo y el coágulo no se desplaza cuando el tubo es invertido. Una reacción 3⁺ ó 4⁺ es considerada como identificación positiva de *S. Aureus* (ver Anexo C).

8. CALCULOS

- 8.1** El número de *S. Aureus* se calcula del porcentaje de colonias confirmadas, en relación con el número total de colonias sospechosas; este valor se multiplica por cuatro (0,25 cm³, muestra inicial) y por el factor de dilución.

9. INFORME DE RESULTADOS

- 9.1** En el informe de resultados debe indicarse el método usado y el resultado obtenido.
- 9.2** Debe indicarse qué medios selectivos se emplearon, así como las condiciones de operación no especificadas en esta norma o consideradas como opcionales, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido sobre el resultado.
- 9.3** Debe incluirse todos los detalles para la completa identificación de la muestra.

(Continúa)

ANEXO A

MEDIOS DE CULTIVO, DILUYENTES Y REACTIVOS

A.1 Agar Baird Parker

A.1.1 Medio base

Triptona	10,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Sodio sulfametacina	0,055 g
Cloruro de litio	5,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1 000 cm ³

A.1.1.1 Preparación. Disolver los componentes en agua por ebullición, con agitación frecuente. Distribuir en frascos (ver 4.6) en cantidades de 90 cm³ y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C ± 1°C. El pH del medio debe ser 6,8,

A.1.2 Medio completo. A las porciones de 90 cm³ del medio base (A.1.1) fundido y enfriado a 45° - 50°C agregar la solución que a continuación se anota, las mismas que deben ser pre-calentadas a 45° - 50°C y esterilizadas por filtración:

Glicina al 20%	6,3 cm ³
Telurito de potasio al 1%	1,0 cm ³
Pirubato de sodio al 20%	5,0 cm ³
Emulsión de yema de huevo oxid	5,0 cm ³

Mezclar bien y luego colocar en porciones de 15 cm³ sobre las cajas *Petri*.

A.2 Infusión cerebro corazón

A.2.1 Composición

Cerebro ovino (infusión)	200,0 g
Corazón vacuno (infusión)	250,0 g
Peptona	10,0 g
Glucosa	2,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato disódico	2,5 g
Agua destilada completar a	1 000 cm ³

(Continúa)

A.2.1.1 Preparación. Se disuelve el medio A.4.1 en 1 000 cm³ de agua destilada. Distribuir en tubos en cantidades de 7 cm³ y esterilizar en autoclave, durante 15 minutos a 121 °C ± 1 °C. El pH final debe ser 7,4.

A.3 Plasma de conejo deshidratado con un contenido de 0,1% de EDTA

A.3.1 El plasma de conejo deshidratado se preparará de acuerdo a las instrucciones del envase.

A.3.2 Tomar de esta solución 0,3 cm³ e incubara 37°C.

A.3.2.1 El plasma rehidratado puede guardarse en el refrigerador entre 0-5°C. Cada lote de plasma debe ser ensayado con cepas conocidas de *S. Aureus* y *S. Epidermis*, para determinar su capacidad para distribuir reacciones coagulasa positiva y negativa.

A.4 Agua buffer peptonada

A.4.1 Composición:

Fosfato disódico	9,0	g
Fosfato monopotásico	1,5	g
Peptona	10,0	g
Cloruro de sodio	5,0	g
Agua destilada estéril	1 000	cm ³

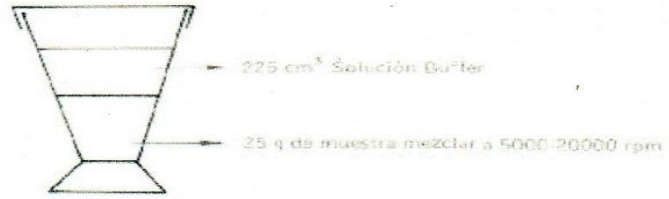
A.4.2 Preparación. Disolvér los componentes en agua por ebullición. Ajustar el pH en forma tal que, luego de la esterilización, sea 7,0 ± 0,1 C. Distribuir en frascos o en tubos, esterilizar en autoclave a 121 °C ± 1°C por 20 minutos.

(Continúa)

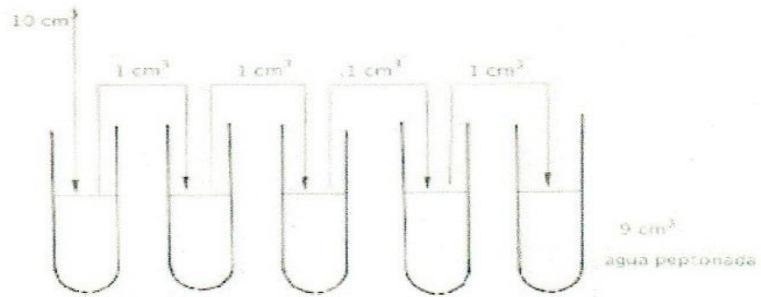
ANEXO B

Enumeración de Staphylococcus Aureus

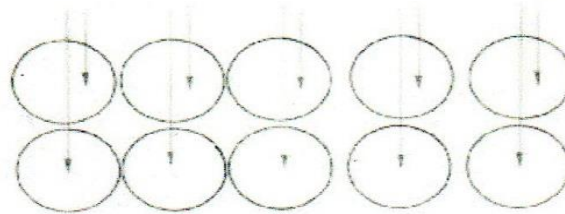
1. Alimento homogenizado
1:10



2. Dilución



3. Pipetear
0,25 cm³ del reactivo agar Baird Parker e incubar a 37°C por 24h00-48h00.

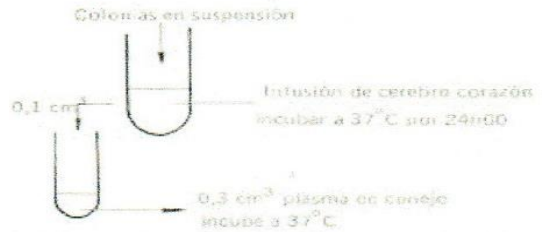


4. Contaje
Colonias de Staphylococcus Aureus

(Colonias negras rodeadas por zona clara)

5. Ensayo para coagulasa

Examinar para coagulasa entre
4h00, 6h00 y 24h00



6. Cálculo número total de coagulasa

(Continúa)

ANEXO C

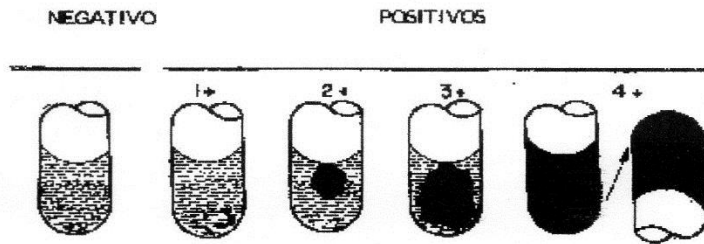


FIGURA 1. Distintos tipos de resultados de la prueba de la coagulasa. Obsérvese que sólo la puntuación 2⁺ o una puntuación mayor se consideran como evidencia positiva de producción de coagulasa. (Negativo= ningún signo de formación de fibrina; 1⁺ = pequeños coágulos no organizados; 2⁺= pequeños coágulos organizados; 3⁺ = gran coágulo organizado; 4⁺ = todo el contenido aparece coagulado 'y se mantiene aun cuando se invierta el tubo).

(Continúa)

APENDICE Z

Z.1 NORMAS A CONSULTAR

INEN 17 *Leche y productos lácteos. Examen microbiológico. Disposiciones generales*
INEN 776 *Carne y productos cárnicos. Muestreo.*

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Norma Uruguay UNIT 538-78. *Carne y sus productos. Detección y recuento de estafilococos coagulasa positiva*, Instituto Uruguayo de Normas Técnicas. Montevideo, 1978.

FAO/FOOD and nutrition paper. 14/4 *Manuals of food quality control 4 microbiological analysis Enumeration of staphylococcus aureus*. Food and agriculture organization of the United Nations. MX Rafón. Rome, 1979.

ANEXO 21

NTE INEN 1529-8

Republic of Ecuador

EDICT OF GOVERNMENT

In order to promote public education and public safety, equal justice for all, a better informed citizenry, the rule of law, world trade and world peace, this legal document is hereby made available on a noncommercial basis, as it is the right of all humans to know and speak the laws that govern them.



NTE INEN 1529-8 (1990) (Spanish): Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y E.coli.

Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria	CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE COLIFORMES FECALES Y <u>E. coli</u>	INEN 1 529-8 1990-02
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece la técnica del número más probable para la determinación de coliformes fecales y las pruebas confirmatorias de <u>Escherichia coli</u> e identificación de las especies del grupo coliforme fecal.</p> <p style="text-align: center;">2. TERMINOLOGIA</p> <p>2.1 Coliformes fecales. Es un grupo de coliformes que en presencia de sales biliares u otros agentes selectivos equivalentes fermenta la lactosa con producción de ácido y gas a temperatura entre 44 y 45,5°C. Este grupo contiene una alta proporción de <u>E. coli</u>, tipo I y II y que en general puede considerarse como equivalente a <u>E. coli</u>, siendo por ello útiles como indicadores de contaminación fecal en los alimentos.</p> <p>2.2 E. coli. Es una especie bacteriana que a más de presentar las características del grupo coliforme fecal, produce indol a partir del triptófano; es positivo a la prueba del rojo de metilo y negativo a la de Voges Proskauer; no utiliza el citrato como única fuente de carbono. Las cepas indol positivas se llaman <u>E. coli</u> Tipo I y se supone que su hábitat natural primario es el intestino.</p> <p>2.3 Recuento de coliformes fecales. Es la determinación del número de coliformes fecales por gramo ó cm³ de muestra de alimento.</p> <p>2.4 Diferenciación de las especies del grupo coliforme fecal. Es el proceso realizado para confirmar la presencia de <u>E. coli</u> y diferenciar las especies y variedades del grupo coliforme fecal mediante el conjunto de pruebas bioquímicas conocidas como "IMVEC".</p> <p>2.5 IMVEC. Es una designación mnemónica de un grupo de cinco pruebas bioquímicas que consiste en:</p> <p>I = Verificación de la producción de indol a partir del triptófano</p> <p>M = Reacción del RM (rojo de metilo) para comprobar el descenso del pH del caldo glucosa tamponado</p> <p>V = Reacción de VP (Voges-Proskauer); para comprobar la producción de acetoina a partir de glucosa.</p> <p>E = Prueba de Eijkman, para comprobar la termotolerancia o crecimiento a 44 - 45,5 ± 0,2°C.</p> <p>C = Utilización del citrato como fuente de carbono.</p> <p style="text-align: center;">3. RESUMEN</p> <p>3.1 Este método se basa en la prueba de Eijkman modificada para detectar la fermentación de la lactosa con producción de gas a 44 - 45,5 ± 0,2°C y complementada con la prueba de indol a esta temperatura, estos ensayos se realizan en caldo brillante-bilis lactosa y en caldo triptona partiendo de un inóculo tomado de cada tubo gas positivo del cultivo para coliformes totales, (ver INEN 1 529-6) e incubados a 45,5 ± 0,2°C. La confirmación de <u>E. coli</u> y la diferenciación de las especies y variedades del grupo coliforme fecal, se realizan mediante los ensayos para indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato sódico.</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p>		

4. EQUIPO Y MATERIALES DE VIDRIO

4.1 Equipo usual en un laboratorio microbiológico en particular.

4.1.1 Citados en numeral 4 de la Norma INEN 1 529-6.

4.1.2 Placas porta objetos.

4.1.3 Baño de agua regulable a $44 - 45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

5.1 Caldo verde brillante bilis-lactosa (BGBL) o similar, ver preparación caldos de cultivo en la Norma INEN 1 529-1.

5.2 Caldo triptona; ver preparación caldos de cultivo en la Norma INEN 1 529-1.

5.3 Agar eosina azul metileno (EMB); ver preparación agares en la Norma INEN 1 529-1.

5.4 Agar de contage en placa (PCA); ver preparación agares en la Norma INEN 1 529-1.

5.5 Caldo MR-VP; ver preparación caldos de cultivo en la Norma INEN 1 529-1.

5.6 Reactivos de Kovacs; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.7 Solución de Rojo de metilo; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.8 Solución de Creatina al 0,5%; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.9 Solución alcohólica de α -naftol al 6%; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.10 Solución de hidróxido de Potasio al 40%; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.11 Agar citrato de Simons; ver preparación agares en la Norma INEN 1 529-1.

5.12 Solución alcohol-acetona; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1 529-1.

5.13 Solución fenicada de cristal violeta al 1%; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1529-1.

5.14 Solución fenicada de fucsina básica al 1%; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1529-1.

5.15 Solución de lugol; ver preparación reactivos en la Norma INEN 1529-1.

(Continua)

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Coliformes fecales

6.1.1 Simultáneamente con el ensayo confirmatorio de la Norma INEN 1 529-6 inocular dos o tres asas de cada uno de los tubos presuntamente positivos en un tubo conteniendo 10 cm³ de caldo BGBL (5.1) y en otro que contenga aproximadamente 3 cm³ de caldo triptona (5.2) (ver esquema 1).

6.1.2 Incubar estos tubos a 45,5 ± 0,2°C (baño María) por 48 horas.

6.1.3 al cabo de este tiempo anotar la presencia de gas en los tubos de BGBL y añadir dos o tres gotas del reactivo de Kovacs a los tubos de agua triptona. La reacción es positiva para el indol si en cinco minutos se forma un anillo rojo en la superficie de la capa de alcohol amílico; en la prueba negativa el reactivo de Kovacs conserva el color original.

6.1.4 Los cultivos gas positivos en caldo verde brillante bilis-lactosa incubados a 30 ó 35°C y a 45,5°C y que producen indol a 45,5°C son considerados coliformes fecales positivos.

6.2 Confirmación de E. coli y diferenciación de las especies del grupo mediante las pruebas IMVIC. En situaciones que justifiquen el esfuerzo y sean necesarias la conformación de E. coli y la diferenciación de las especies del grupo coliforme fecal, realizar los ensayos para indol, rojo de metilo, Voges Praskauer y citrato sódico (Pruebas IMViC), de la siguiente forma:

6.2.1 De cada tubo de caldo BGBL que sea positivo para coliformes fecales (6.1), sembrar por estría un asa en una placa individual de agar eosina azul de metilo o agar VRB previamente seca e identificada.

6.2.2 Incubar las placas invertidas a 35 - 37°C por 24 horas.

6.2.3 Para confirmar la presencia de E. coli, de cada placa escoger 2 - 3 colonias bien aisladas y típicas (negra o nucleada con brillo verde metálico de 2 - 3 mm de diámetro) y sembrar en estría en tubos de agar PCA o agar nutritivo inclinado e incubar los cultivos a 35 - 37° por 24 horas.

6.2.4 Hacer extensiones a partir de los cultivos en agar PCA o nutritivo inclinado y teñirlos por el método de Gram, si se comprueba la pureza de los cultivos de sólo bacilos Gram. negativos no esporulados, utilizar éstos para la prueba IMViC.

6.2.5 Prueba para indol Sembrar en un tubo de agua triptona un asa de cultivo puro (6.2.4), incubar 24 horas a 35 - 37°C. Añadir al tubo 0,5 cm³ del reactivo de Kovacs. La aparición de un color rojo oscuro en la superficie del reactivo, indica una prueba positiva. En la prueba negativa el reactivo conserva el color original.

6.2.6 Prueba del rojo de metilo (RM). Sembrar en un tubo de caldo MR-VP un asa de cultivo puro (6.2.4) incubar 24 horas a 35 - 37°C, añadir a cada tubo aproximadamente 3 gotas de la solución de rojo de metilo, agitar; si el cultivo se torna rojo la prueba es positiva y negativa si hay viraje a amarillo.

(Continúa)

6.2.7 Prueba de Voges-Proskauer (VP). Sembrar en un tubo de caldo MR-VP un asa de cultivo puro (6.2.4) e incubar 24 horas a 35 - 37°C.

6.2.7.1 Luego de este período, añadir los siguientes reactivos cuidando de agitar el tubo después de cada adición:

- solución de creatina al 0,5%. 2 gotas
- solución alcohólica de α -naftol al 6% 3 gotas
- solución de hidróxido de potasio al 40% : 2 gotas.

6.2.7.2 Observar dentro de 15 minutos. La aparición de un color rosado o rojo brillante, generalmente al cabo de cinco minutos el resultado es positivo.

6.2.8 Prueba para la utilización del citrato. Un asa del cultivo puro (6.2.4) sembrar por estría en la superficie de la lengüeta de agar citrato inclinado e incubar 24 horas a 35 - 37°C. La reacción es positiva si hay crecimiento visible que se manifiesta por lo general en el cambio de color del medio, de verde a azul.

6.2.9 Considerar como E. coli a los microorganismos que presentan las siguientes características: bacilos Gram. negativos no esporulados que producen gas de la lactosa y reacción IMVEC ver Tabla 1.

7. CALCULOS

7.1 Coliformes fecales

7.1.1 Calcular la densidad de coliformes fecales sólo en base del número de tubos que a 45,5°C presentan gas en el caldo BEGL e indol en el caldo triptona, seguir las instrucciones de los numerales 8, 9 y 10 de la Norma INEN 1 529-6

7.2 E. coli. Para determinar el NMP de E. coli proceder según las instrucciones de los numerales 8, 9 y 10 de la Norma INEN 1 529-6 basándose únicamente en todos los tubos que presentan bacilos con las características indicadas en el numeral 6.2.9.

8. INFORME DE RESULTADOS

8.1 Coliformes fecales. Reportar NMP de coliformes fecales/g ó cm³ de muestra.

8.2 E. coli.

8.2.1 Reportar NMP de E. coli/g ó cm³ de muestra

(Continua)

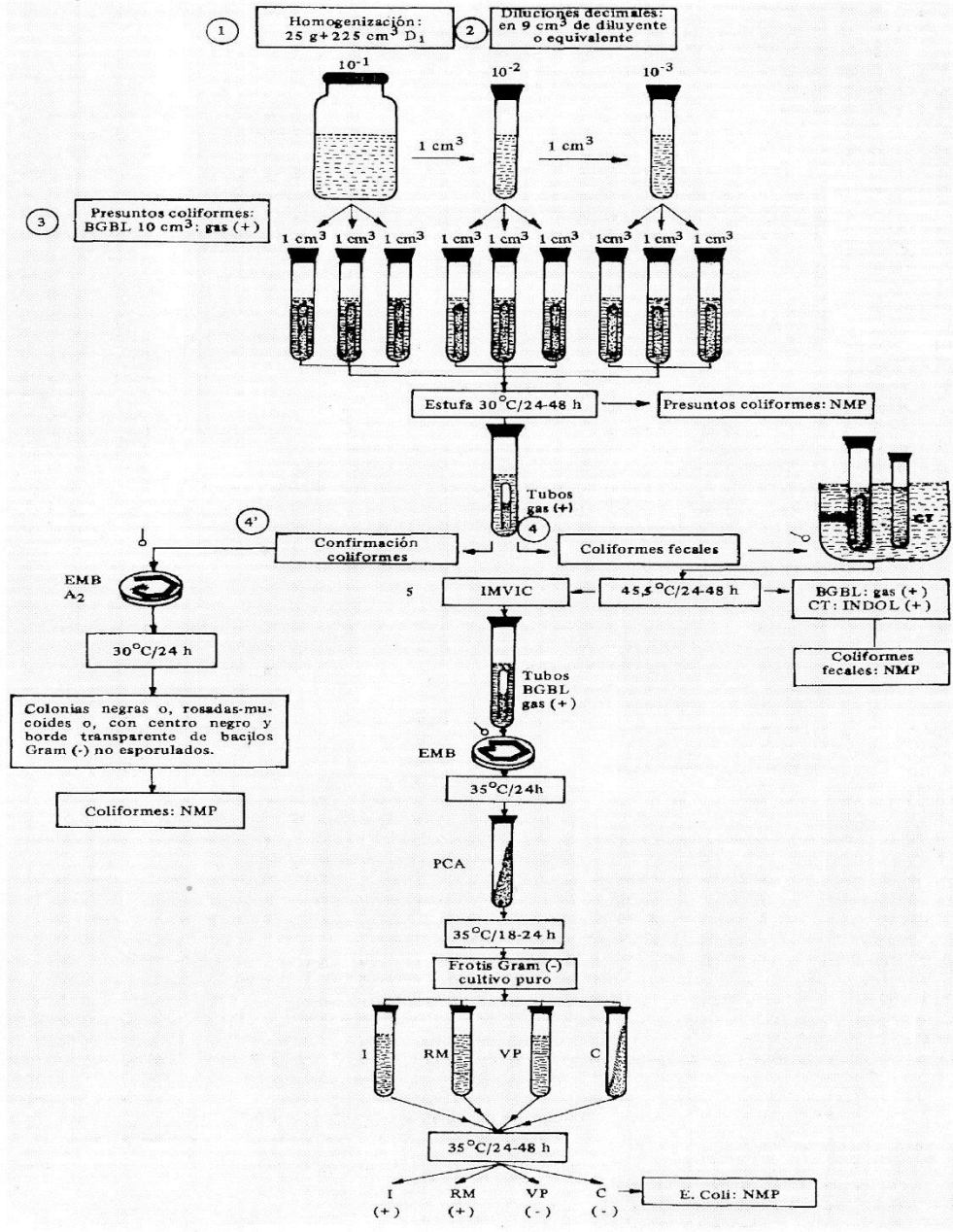
TABLA 1

CLASIFICACION DE LOS COLIFORMES POR LAS PRUEBAS "IMViC"					
	Gas en caldo B.G.B.L. 44 - 45,5° C	Prueba del indol 44 - 45,5° C	MR	VP	Crecimiento en Citrato
E. coli					
- Típico (tipo I)	+	+	+	-	-
-Atípico (tipo II)	-	-	+	-	-
Intermedios					
Típicos (tipo II)	-	+	+	-	+
Atípicos (tipo I)	-	-	+	-	+
Enterobacter-ae rógenes:					
Típico (tipo I)	-	-	-	+	+
Atípico (tipo II)	-	+	-	+	+
Esterobacter-cloacae	-	-	-	+	+
Irregulares:					
- Tipo I	-	-	-	-	-
- Tipo II	+	-	-	-	-
- Tipo V I	+	-	+	+	+
Irregulares, otros tipos	V *	V *	V *	V *	V *

(Continua)

ESQUEMA

COLIORMES TOTALES, FECALES, E. COLI



(Continua)

APENDICE Z

Z.1 NORMAS A CONSULTAR

- INEN 1 529-1 *Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo.*
INEN 1 529-6 *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable.*

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Norma International ISO 4831 *Microbiology General Guidance for the enumeration of Coliforms - Most probable number Technique at 30°C.* Primera edición. Ginebra 1978.

I.C.M.S.F. *Microorganismos de los alimentos 1.* Técnicas del análisis microbiológico. Editorial Acribia, Zaragoza, España.

FAO-FOOD AND NUTRITION PAPEL 14/4 *Manual of food quality control 4. Microbiological analysis.* Roma. 1979.

Food and Drug Administration Bureau of foods Division of Microbiology, *Bacteriological Analytical Manual.* 5ta. edición. 1978.

Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. *Método de examen microbiológico para alimentos y bebidas.* Normas recomendadas. Manual Práctico, Madrid, 1976.

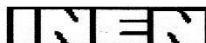
International Dairy Federation; FIL-IDF-73 *Milk and Mild Products count of Coliform Bacteria,* Internacional Dairy Federation. Bruselas, 1974.

Mossel D.A. Moreno García B. *Microbiología de los alimentos,* Editorial Acriba., Zaragoza, España, 1982.

Harrigan, W.F. McLance, M.E. *Métodos de laboratorio en microbiología de los alimentos y productos lácteos.* León, España, 1979.

ANEXO 22

NTE INEN 1529-5



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 1 529-5:2006
Primera revisión

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS.
DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE
MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. REP.**

Primera Edición

MICROBIOLOGICAL CONTROL IN FOODS. DETERMINATION OF THE QUANTITY OF AEROBIC MESOPHILIC MICROORGANISMS. PCA.

First Edition

DESCRIPTORES: Microbiología de los alimentos, ensayo, REP.
AL 01.05-303
CDU: 579.67
CIU: 9320
ICS: 07.100.30:67.050

Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria	CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. REP.	NTE INEN 1 529-5:2006 Primera revisión 2006-01
---	--	---

1. OBJETIVO

1.1 Esta norma establece el método para cuantificar la carga de microorganismos aerobios mesófilos en una muestra de alimento destinado al consumo humano o animal.

2. ALCANCE

2.1 Este método de ensayo solo permitirá cuantificar la presencia de grupos de microorganismos aerobios mesófilos.

3. DEFINICIONES

3.1 Microorganismos aerobios mesófilos son aquellos microorganismos que se desarrollan en presencia de oxígeno libre y a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una zona óptima entre 30°C y 40°C.

3.2 REP es el recuento de microorganismos aerobios mesófilos por gramo o centímetro cúbico de muestra de alimento.

4. RESUMEN

4.1 Este método se basa en la certeza de que un microorganismo vital presente en una muestra de alimento, al ser inoculado en un medio nutritivo sólido se reproducirá formando una colonia individual visible. Para que el conteo de las colonias sea posible se hacen diluciones decimales de la suspensión inicial de la muestra y se inocula el medio nutritivo de cultivo. Se incuba el inóculo a 30°C por 72 horas y luego se cuenta el número de colonias formadas. El conteo sirve para calcular la cantidad de microorganismos por gramo o por centímetro cúbico de alimento.

4.2 **Limitaciones del método.** Se debe considerar que el valor numérico obtenido puede no reflejar el número real de microorganismos vitales (viables) en la muestra debido a las siguientes condiciones:

4.2.1 Las células microbianas suelen agruparse formando cadenas, grumos, racimos o pares y no separarse a pesar de la homogeneización y dilución de la muestra, por tanto, una colonia puede provenir de una célula individual o de un agrupamiento bacteriano.

4.2.2 Las células microbianas que han sufrido graves lesiones son incapaces de multiplicarse;

4.2.3 Las condiciones inadecuadas de aerobiosis, nutrición y temperatura; la presencia de inhibidores y el uso incorrecto.

5. DISPOSICIONES GENERALES

5.1 Todo el material a utilizarse en la determinación debe estar perfectamente limpio y estéril.

5.2 El área de trabajo debe estar constituida por una mesa nivelada, de superficie amplia, limpia, desinfectada, bien iluminada, situada en una sala de aire limpio, libre de polvo y corrientes de aire.

(Continúa)

DESCRIPTORES: Microbiología de los alimentos, ensayo, REP.

5.3 La carga microbiana del aire debe ser controlada durante el ensayo y, para una exposición del medio de cultivo a él por 15 min, no debe exceder de 15ufc/placa; de superarse este valor los ensayos deben ser anulados.

5.4 Todas las demás áreas del laboratorio deben estar libres de polvo, de insectos y guardar protegidos el material y suministros.

6. MATERIALES Y MEDIOS DE CULTIVO

6.1 Materiales

6.1.1 Pipetas serológicas de punta ancha de 1, 5 cm³ y 10 cm³ graduadas en 1/10 de unidad.

6.1.2 Cajas Petri de 90 mm x 15 mm,.

6.1.3 Erlenmeyer y/o frasco de boca ancha de 100 cm³, 250 cm³, 500 cm³ y 1 000 cm³ con tapa de rosca autoclavable.

6.1.4 Tubos de 150 mm x 16 mm

6.1.5 Gradillas

6.1.6 Contador de colonias

6.1.7 Balanza de capacidad no superior a 2 500 g y de 0,1 g de sensibilidad.

6.1.8 Baño de agua regulado a 45°C ± 1°C.

6.1.9 Incubador regulable (25°C - 60°C)

6.1.10 Autoclave.

6.1.11 Refrigeradora para mantener las muestras y medios de cultivo

6.1.12 Congelador para mantener las muestras a temperatura de -15°C a -20°C

6.2 Medios de cultivo

6.2.1 Agar para recuento en placa (Plate Count Agar). Preparación (ver Agares en la NTE INEN 1529-1)

6.2.2 Agua peptonada al 0,1 % (diluyente). Preparación (ver diluyentes en la NTE INEN 1 529-1)

7. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

7.1 Preparar la muestra según uno de los procedimientos indicados en la NTE INEN 1 529-2

8. PROCEDIMIENTO

8.1 Para cada dilución el ensayo se hará por duplicado. En cada una de las cajas Petri bien identificadas se depositará 1 cm³ de cada dilución. Para cada depósito se usará una pipeta distinta y esterilizada.

8.2 Inmediatamente, verter en cada una de las placas inoculadas aproximadamente 20 cm³ de agar para recuento en placa-PCA, fundido y templado a 45°C ± 2°C. La adición del medio no debe pasar de más de 45 minutos a partir de la preparación de la primera dilución.

(Continúa)

8.3 Cuidadosamente, mezclar el inoculo de siembra con el medio de cultivo imprimiendo a la placa movimientos de vaivén: 5 veces en el sentido de las agujas del reloj y 5 veces en el contrario.

8.4 Como prueba de esterilidad verter agar en una caja que contenga el diluyente sin inocular. No debe haber desarrollo de colonias.

8.5 Dejar reposar las placas para que se solidifique el agar.

8.6 Invertir las cajas e incubarlas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 a 75 horas.

8.7 No apilar más de 6 placas. Las pilas de placas deben estar separadas entre sí, de las paredes y del techo de la incubadora.

8.8 Pasado el tiempo de incubación seleccionar las placas de dos diluciones consecutivas que presenten entre 15 y 300 colonias y utilizando un contador de colonias, contar todas las colonias que hayan crecido en el medio, incluso las pequeñas, pero, se debe tener cuidado para no confundirlas con partículas de alimentos o precipitados, para esto, utilizar lupas de mayor aumento.

8.9 Las colonias de crecimiento difuso deben considerarse como una sola colonia si el crecimiento de este tipo de colonias cubre menos de un cuarto de la placa; si cubre más la caja no será tomada en cuenta en el ensayo.

8.10 Anotar el número de colonias y la respectiva dilución.

9. CALCULOS

9.1 Caso general (placas que contienen entre 15 y 300 colonias).

9.1.1 Calcular el número N de microorganismo por gramo o cm^3 de producto como la media ponderada de dos diluciones sucesivas utilizando la siguiente fórmula:

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

En donde:

- $\sum c$ = Suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas;
- V = Volumen inoculado en cada caja Petri;
- n_1 = Número de placas de la primera dilución seleccionada;
- n_2 = Número de placas de la segunda dilución seleccionada;
- d = Factor de dilución de la primera dilución seleccionada (d = 1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir).

9.1.2 Redondear los resultados obtenidos a dos cifras significativas. Cuando la tercera cifra comenzando por la izquierda es menor que 5, mantener inalterada la segunda cifra. Si la tercera cifra es mayor o igual a cinco, incrementar en una unidad la segunda cifra. Expresar como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por 10^x , donde x es la correspondiente potencia de 10.

Ejemplo:

Se obtiene los siguientes resultados (dos placas por dilución):
 primera dilución seleccionada (10- 2): 225 y 178 colonias,
 segunda dilución seleccionada (10- 3): 25 y 15 colonias,

(Continúa)

$$N = \frac{225 + 178 + 25 + 15}{1(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}}$$

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

$$N = 20136$$

Redondeando:

$$20\ 000 = 2,0 \times 10^4$$

9.2 Recuentos estimados

9.2.1 Si dos placas inoculadas con muestra no diluida (productos líquidos), o con la suspensión inicial (otros productos) o con la primera dilución inoculada o retenida contienen menos de 15 colonias, calcular el número estimado N_E de microorganismos presentes por gramo o cm^3 de producto como una media aritmética m de las colonias contadas en las dos placas utilizando la siguiente ecuación:

$$N_E = \frac{\sum c}{V \times n \times d}$$

- $\sum c$ = suma de las colonias contadas en las dos placas;
- V = volumen inoculado en cada placa;
- n = número de placas seleccionadas (en este caso, $n = 2$).
- d = factor de dilución de la suspensión inicial o de la primera dilución inoculada o seleccionada ($d = 1$ cuando se inocula un producto líquido sin diluir).

Ejemplo:

Se obtiene los siguientes resultados:

Primera dilución retenida (10-2): 12 y 13 colonias.

$$N_E = \frac{12 + 13}{1 \times 2 \times 10^{-2}}$$

$$N_E = \frac{25}{0,02}$$

$$N_E = 1250$$

Redondeando

$$N_E = 1300$$

$$N_E = 1,3 \times 10^3$$

(Continúa)

En los productos líquidos, $N_E = m$

9.2.2 Si las dos placas inoculadas con la muestra sin diluir (productos líquidos), o con la primera dilución o con la suspensión inicial (otros productos) no presentan colonias, expresar los resultados de la siguiente manera:

$$N_E \leq 1/d$$

En donde:

N_E = cantidad de microorganismos por gramo o por centímetro cúbico
 d = factor de dilución (ver numeral 9.2.1)

10. INFORME DE RESULTADOS

10.1 Informar como número N de microorganismos por gramo o cm^3 de muestra utilizando solo dos cifras significativas, según lo indicado en el numeral 9.1.

10.1.1 El resultado obtenido en el ejemplo indicado en 9.1.2 se expresaría de la siguiente manera:

- N de microorganismos/g o $\text{cm}^3 = 2,0 \times 10^4$

10.1.2 El resultado obtenido en el ejemplo indicado en 9.2.1, se expresaría de la siguiente manera:

- N_E de microorganismos/g ó $\text{cm}^3 = 1,3 \times 10^3$

10.1.3 El resultado obtenido en el ejemplo indicado en 9.2.2 se expresaría de la siguiente manera:

- N_E de microorganismos/g ó $\text{cm}^3 \leq 1,0/d$

(Continúa)

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

- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-1:1999 *Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-2:1999 *Control microbiológico de los alimentos. Preparación de muestras.*

Z.2 BASES DE ESTUDIO

International Standard ISO 7218:1996 and Amendment 1:2001 *Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations.* International Organization for Standardization. Geneva, 1996.

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Documento: TÍTULO: CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS Alimentos. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE AL 01.05-303
NTE INEN 1 529-5 MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. REP. Código:

Primera revisión

ORIGINAL:

Fecha de iniciación del estudio:

REVISIÓN:

Fecha de aprobación anterior por Consejo Directivo
Oficialización con el Carácter de
por Acuerdo No. de
publicado en el Registro Oficial No. de

Fecha de iniciación del estudio:

Fechas de consulta pública: de

a

Comité Interno del INEN

Fecha de iniciación: 2005-01-12

Fecha de aprobación: 2005-01-12

Integrantes del Comité Interno:

NOMBRES:

Dr. Ramiro Gallegos (Presidente)

Dra. Hipatia Navas

Dr. Hugo Ayala

Ing. Gonzalo Arteaga (Secretario Técnico)

INSTITUCIÓN REPRESENTADA:

DIRECTOR DEL ÁREA TÉCNICA DE
SERVICIOS TECNOLÓGICOS
ÁREA TÉCNICA DE SERVICIOS
TECNOLÓGICOS
ÁREA TÉCNICA DE CERTIFICACIÓN
ÁREA TÉCNICA DE NORMALIZACIÓN

Otros trámites:

El Consejo Directivo del INEN aprobó este proyecto de norma en sesión de 2005-10-26

Oficializada como: Voluntaria
Registro Oficial No. 188 de 2006-01-16

Por Acuerdo Ministerial No. 06-004 de 2006-01-02

ANEXO 23

STANDARD METHODS AGAR

Uso

El Agar Métodos Estandar es un medio utilizado para el recuento de bacterias aeróbicas a partir de agua, aguas residuales, alimentos y productos lácteos. Este medio también es conocido como Agar Cuenta Estándar (DIBICO, 2007).

Preparación

Método

Suspender 23.5 g del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Dejar enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en placas de Petri estériles (DIBICO, 2007).

Procedimiento

- 1.- Consultar las referencias apropiadas respecto a los procedimientos para procesar y sembrar muestras de alimentos, agua y otros materiales.
- 2.- Colocar alícuotas de la muestra en las placas Petri y vaciar el medio enfriado a 45°C. Mezclar, dejar solidificar e incubar. Este medio también puede utilizarse para hacer la siembra por filtración de membrana.
- 3.- Incubar las placas a 35 °C durante 18-24 horas.

Resultados

Después del período de incubación se hace el conteo de colonias ya sea en la superficie del filtro o en el seno del medio, dependiendo de la técnica utilizada (DIBICO, 2007).

ANEXO 24

Baird Parker agar

Uso

Es un medio moderadamente selectivo y de diferenciación para el aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus* en alimentos, muestras ambientales y clínicas.

Instrucciones

Suspender 60 g del polvo en 940 ml de agua purificada. Dejar en reposo 5 a 10 minutos.

Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto, hasta disolución total. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45°C-50°C y agregar 50 ml de emulsión de yema huevo y 10 ml de la solución de telurito.

Homogenizar y distribuir en placas de Petri estériles.

Incubación

En aerobiosis, a 35-37°C durante 24 a 48 horas.

Precauciones

- Solamente para uso diagnóstico in vitro. Uso profesional exclusivo.
- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado
- No utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.
- Utilizar guantes y ropa protectora cuando se manipula el producto (Britania, 2010).

ANEXO 25

Agar Nutritivo

Uso

Medio utilizado para propósitos generales, para el aislamiento y recuento de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales.

Su uso esta descrito en procedimientos para el análisis de alimentos, aguas y otros materiales de importancia sanitaria.

Instrucciones

Colocar los frascos cerrados en baño maría y llevar a ebullición para fundir el medio de cultivo sólido contenido en los mismos.

Una vez que se ha fundido el medio de cultivo, retirar cuidadosamente los frascos del baño maría y dejar enfriar.

Cuando alcanzan temperatura 45-50°C, abrirlos y distribuir aproximadamente 15 ml en placas de Petri estériles.

Incubación

El tiempo, la temperatura, y la atmosfera de incubación, dependerán del microorganismo que se quiera recuperar.

Bacterias de fácil crecimiento: en aerobios, a 35-37°C durante 18 a 24 horas.

Precauciones

-Solamente para uso diagnostico in vitro. Uso profesional exclusivo.

-No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado (Britania, 2010).

ANEXO 26

Agar XLD

Uso

El agar XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato) es un medio selectivo diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de patógenos entéricos Gram negativos, especialmente del género *Shigella* (Mast, 2014)

Preparación

Suspender 57 g de medio en un litro de agua destilada. Mezclar vigorosamente. Calentar con agitación suave hasta que el medio llegue a ebullición. Evitar el sobre calentamiento ya que puede provocar la precipitación del medio. Este medio no se puede esterilizar por autoclave. Enfriar a una temperatura entre 45-50 °C en un baño de maría y verter en placas de Petri estériles (Mast, 2014)

2.7.1.1.1. Colonias típicas

Las colonias sospechosas de *Shigella* sobre el agar XLD son transparentes y parecen rojas por el color del medio. Este género bacteriano al no fermentar la xilosa, la lactosa, ni la sacarosa, no da lugar a que el rojo fenol vire a amarillo. Como estos microorganismos tampoco tienen la capacidad de alcalinizar el medio por la descarboxilación de la lisina, no se produce color rojo púrpura alrededor de las colonias.

Las colonias típicas de la *Salmonella* son de color rojo con el centro negro debido a la producción de H₂S. Mientras que las de *E. coli* son grandes, amarillas con o sin precipitado de bilis (Mast, 2014).

ANEXO 27

Agar Levine (Agar eosina-azul de metileno)

Uso

Medio utilizado para la búsqueda y diferenciación de bacilos entéricos a partir de muestras clínicas, alimentos y otros materiales de importancia sanitaria.

Instrucciones

Medio de cultivo listo para usar en frascos

Colocar los frascos cerrados en baño maría y llevar a ebullición para fundir el medio de cultivo sólido contenido en los mismos.

Una vez que se ha fundido el medio de cultivo, retirar cuidadosamente los frascos del baño maría y dejar de enfriar.

Cuando alcanzan temperatura 45-50°C, abrirlos y distribuir aproximadamente

Precauciones

- Solamente para uso diagnostico in vitro. Uso profesional exclusivo.
- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.
- No utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, asi como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.
- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente y siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.
- Las características del producto pueden alterarse si no se conservan adecuadamente (Britania, 2010).
- Descartar el producto que no a sido utilizado y los desechos mismo según reglamentaciones vigentes (Britania, 2010).

ANEXO 28

SIM Medio

Uso

Medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno por los microorganismos.

Es útil para diferenciar miembros de la familia Enterobacteriaceae.

Instrucciones

Suspender 30 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto para disolución total. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121 °C.

Enfriar y solidificar en posición vertical

Precauciones

- Solamente para uso diagnostico invitro. Uso profesional exclusivo.
- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.
- No utilizar el producto se existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.
- Utilizar guantes y ropa protectora cuando se manipula el producto.
- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.
- Descartar el producto que no ha sido utilizado y los desechos del mismo según reglamentaciones vigentes (Britania, 2010).

ANEXO 29

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	gl	C
H								
p								
Muestra 1	104.00	1	9.40	0.00	9.40	3.00	2	1.00
2.00	>0.9999							
Muestra 1	105.00	1	5.00	0.00	5.00	2.00		
Muestra 1	106.00	1	1.70	0.00	1.70	1.00		

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	gl	C
H								
p								
Muestra 2	104.00	1	4.50	0.00	4.50	2.00	2	1.00
2.00	>0.9999							
Muestra 2	105.00	1	4.70	0.00	4.70	3.00		
Muestra 2	106.00	1	1.40	0.00	1.40	1.00		

Variable	TRATAMIENTO	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	gl	C
H								
p								
Muestra 3	104.00	1	9.00	0.00	9.00	3.00	2	1.00
2.00	>0.9999							
Muestra 3	105.00	1	6.60	0.00	6.60	2.00		
Muestra 3	106.00	1	1.80	0.00	1.80	1.00		