



GERARDO A. LEOTTA  
Editor

# MANUAL PARA **LABORATORIOS** DE PLANTAS FRIGORÍFICAS **BOVINAS**



Consorcio de Exportadores de  
Carnes Argentinas

## PRÓLOGO

El Consorcio de Exportadores de Carnes Argentinas (Consorcio ABC) es una entidad civil sin fines de lucro que nuclea a las empresas frigoríficas del sector, con los más altos estándares de calidad y que representan más del 80% de las exportaciones de carnes vacunas de la Argentina. Su principal objetivo es impulsar un compromiso mayor con la actividad del sector, apuntando a construir una industria vigorosa bajo normas de calidad con los más altos estándares de exigencias, compromiso con el bienestar animal, respeto por el medio ambiente y generadora de riqueza para toda la cadena bovina, desde el productor hasta el consumidor. Las empresas integrantes del Consorcio ABC entienden que la cooperación entre ellas, con otras entidades del sector y con las autoridades gubernamentales es el camino para ejecutar eficazmente un programa de crecimiento que genere inversiones, valor agregado, divisas y empleo calificado a nivel nacional. En este contexto, se asume que la promoción de la formalidad del complejo agroindustrial de las carnes bovinas contribuye al desarrollo económico y productivo de la Nación.

Las 22 empresas asociadas al Consorcio ABC, que operan cerca de 30 establecimientos industriales en siete provincias argentinas, son responsables de uno de cada tres animales procesados por la industria frigorífica en el país. Son las fábricas más modernas del sector en nuestro país, y cumplen con los exigentes requisitos sanitarios requeridos para el acceso a mercados como la Unión Europea, Estados Unidos, Israel, China y Chile, entre otros.

El Consorcio ABC, junto con otras entidades de la cadena de las carnes bovinas, interviene en el diseño y desarrollo de estrategias dirigidas a mejorar la competitividad, condición necesaria para expandir las exportaciones y alcanzar metas de crecimiento sostenido de la cadena de valor. Para ello, es necesario garantizar el cumplimiento de los estándares más exigentes en materia de sanidad e inocuidad, aspectos centrales para ofrecer un producto único a nivel mundial. Las plantas pertenecientes al Consorcio ABC poseen atributos de calidad certificados tales como BRCGS, ISO (9.001, 14.001, 22.000), IFS, FSSC 22000, IRAM (HACCP, BPM), North American Meat Institute, Angus, Sello Alimentos Argentinos, HQB, Kosher, Halal, SMETA, entre otras.

Los laboratorios en plantas frigoríficas cobraron una especial relevancia para la verificación de los procesos y cumplir con los más altos estándares de calidad, tanto en Argentina como en el mundo. Desde el Consorcio ABC nos propusimos recopilar y sistematizar normas, metodologías y técnicas para instalar o adecuar un laboratorio de microbiología al servicio de una planta frigorífica bovina. Consideramos necesario disponer de una guía para unificar la aplicación de buenas prácticas de laboratorio en todas las plantas, así como reconocer y utilizar adecuadamente equipos, instrumentos, materiales y métodos rápidos disponibles en Argentina; expresar e interpretar los resultados según criterios microbiológicos por destino de productos y subproductos cárnicos; comparar la equivalencia de los diferentes métodos microbiológicos tradicionales y métodos rápidos destinados al análisis microbiológico de productos y subproductos cárnicos bovinos. Además, disponer de elementos para seleccionar proveedores analíticos, considerando requisitos de calidad además del precio.

Este manual pretende ser una guía para la adecuación de los objetivos de cada laboratorio y de cada planta frigorífica. Consta de 10 capítulos, redactados por analistas, directores técnicos, responsables de desarrollo y referentes de laboratorios acreditados bajo la Norma ISO 17025 y autorizados por el Senasa, investigadores del CONICET, profesionales de la Dirección General de Laboratorios y Control Técnico del Senasa y de la Agencia de Control Gubernamental de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Se trata de un manual especialmente dedicado a los laboratorios de plantas frigoríficas bovinas, para consolidar las herramientas de verificación de procesos.

El Manual para Laboratorios de Plantas Frigoríficas Bovinas es el primero de su tipo y el primero en ser editado por el Consorcio de Exportadores de Carnes Argentinas.



**Mario Ravettino**  
*Presidente*  
Consorcio de Exportadores de Carnes Argentinas

# AUTORES

## EDITOR

### **Gerardo A. Leotta**

Médico Veterinario, Bacteriólogo Clínico e Industrial, Doctor en Ciencias Veterinarias (Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata). Magister en Microbiología Molecular (Universidad Nacional de San Martín). Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Sistemas Alimentarios Sustentables (UEDD INTA CONICET), Argentina. Asesor Técnico del Consorcio de Exportadores de Carnes Argentinas (ABC) mediante Convenio entre CONICET y Consorcio ABC.

## AUTORES

- **Alli Carlos.** Licenciado en Ciencias Químicas (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires). Auditor en la Norma ISO/IEC 17025. Consultor en Normas ISO 9001. Docente en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). Responsable de la Coordinación de Activos y Residuos Químicos, Dirección General de Laboratorios y Control Técnico, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa) y de la Secretaría Técnica del Comité Codex de Residuos de Medicamentos Veterinarios en Alimentos (CCRVDF).
- **Babich Jessica.** Bioquímica (Universidad J. F. Kennedy). A cargo del Departamento de Microbiología de los Alimentos, Coordinación de Calidad e Inocuidad de Alimentos de Origen Animal, DLA-DGLyCT, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa). Integrante de los grupos de trabajo de Criterios Microbiológicos de la CONAL, del Comité Nacional del CODEX sobre Higiene de los Alimentos y de la Red PulseNet América Latina y el Caribe.
- **Barril Patricia Angélica.** Licenciada en Biotecnología, Doctora en Ciencias Básicas y Aplicadas (Universidad Nacional de Quilmes). Investigadora del CONICET en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI), Centenario, Neuquén, Argentina.
- **Beltrán Orellana Karen Giselle.** Técnica Bromatóloga Universitaria (Universidad Nacional de Lanús-UNLa). Estudiante avanzada de la Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (UNLa). Técnica Analista del Laboratorio de Compañía Bernal S.A.
- **Brusa Victoria.** Médica Veterinaria y Doctora en Ciencias Veterinarias (Universidad Nacional de La Plata-UNLP). Docente en la Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos (Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP). Investigadora del CONICET en el IGEVET - Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando N. Dulout” (UNLP-CONICET LA PLATA).
- **Burgos Rodrigo.** Microbiólogo de Alimentos (Universidad Técnica Nacional de Chile). Post Graduado en Tecnología y Diseño de Alimentos (Universidad de Santiago de Chile). Certificado en Marketing Científico (STRATEX Miami). Licenciado en Psicología (Universidad Maimonides). Agriculture, Food and Life Product Manager. Food Lab Testing - SGS Argentina.
- **Cap Mariana.** Médica Veterinaria (Universidad de Buenos Aires). Magister en Microbiología Molecular (Universidad Nacional de San Martín). Doctora en Ciencias Veterinarias (UBA). Docente en la Universidad Nacional de Hurlingham. Investigadora del CONICET en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Sistemas Alimentarios Sustentables (UEDD INTA CONICET). Jefe de Microbiología en el Instituto de Tecnología de Alimentos (INTA).
- **Chiarizia Juan Cruz.** Técnico Superior en Alimentos (Instituto Superior Gumercinda del Carmen Cassatti). Estudiante avanzado de Ciencias Veterinarias (Universidad Nacional de La Plata). Técnico Analista del Laboratorio de Compañía Bernal S.A.
- **Costa Magdalena.** Médica Veterinaria y Doctora en Ciencias Veterinarias (Facultad de Ciencias Veterinarias-FCV, Universidad Nacional de La Plata-UNLP). Docente en la Cátedra de Microbiología Aplicada, Carrera de Microbiología (FCV-UNLP). Investigadora del CONICET en el IGEVET - Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando N. Dulout” (UNLP-CONICET LA PLATA), La Plata, Argentina.

- **Epszteyn Sergio Alejandro.** Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires). Magister en Microbiología (Universidad Hebreo de Jerusalén). Subgerente Operativo del Laboratorio de Investigación y Monitoreo de la Dirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- **Escobar Pablo.** Técnico Bromatólogo Universitario (Universidad Nacional de Lanús). Estudiante avanzado de la Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (UNLa). Técnico Analista del Laboratorio de Compañía Bernal S.A.
- **Hortel Magdalena.** Analista en Calidad de Alimentos (Instituto Superior Gumercinda del Carmen Cassatti). Responsable del Área de Microbiología del Laboratorio de Compañía Bernal S.A. Jefe del Laboratorio de Compañía Bernal S.A.
- **Marchionni Nicolas.** Ingeniero Mecánico y Especialista en Ingeniería Ambiental (Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional La Plata). Asistente de Calidad del Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI), Centenario, Neuquén, Argentina.
- **Oteiza Juan Martín.** Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Mar del Plata). Doctor en Ciencias Exactas (Universidad Nacional de La Plata). Investigador del CONICET en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI), Centenario, Neuquén, Argentina.
- **Paolini Julián.** Licenciado en Tecnología de los Alimentos (Universidad Nacional del Comahue). Experiencia en laboratorio de análisis de alimentos y agua desde 2001. Gerente de Laboratorios y Director Técnico ante el Senasa del Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI), Villa Regina, Río Negro, Argentina.
- **Rivero Alejandra.** Técnica Bromatóloga Universitaria (Universidad Nacional de Lanús). Estudiante avanzada de la Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (UNLa). Técnica Analista del Laboratorio de Compañía Bernal S.A. Responsable de la Gestión de la Calidad del Laboratorio en Compañía Bernal S.A. garantizando la implementación de la Norma IRAM-ISO/IEC 17025:2017.
- **Següino Silvana.** Licenciada en Tecnología de los Alimentos (Universidad Nacional del Comahue). Experiencia en el área de Aseguramiento de Calidad de laboratorios de ensayos, implementación de normas ISO para asegurar la competencia técnica y la integridad del sistema de gestión. Coordinadora de Calidad desde 2007 del Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI), Villa Regina, Río Negro, Argentina.
- **Teitelbaum David.** Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional de Rosario). Experiencia en la industria frigorífica desde 1989. Responsable de Laboratorios y Microbiólogo de Referencia del Grupo Minerva Foods en Argentina.

## REVISORES

- **Bobbio Diego.** Técnico de Laboratorio (Universidad Nacional de La Plata). Estudiante avanzado de Biotecnología y Biología Molecular (UNLP). Experiencia en laboratorio de análisis de alimentos desde 2016. Coordinador de laboratorio en el Frigorífico Gorina.
- **Brusa Victoria.** Médica Veterinaria y Doctora en Ciencias Veterinarias (FCV-UNLP). Docente Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). Investigadora del CONICET en el IGEVET - Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando N. Dulout” (UNLP-CONICET LA PLATA).
- **Costa Magdalena.** Médica Veterinaria y Doctora en Ciencias Veterinarias (FCV-UNLP). Docente Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). Investigadora del CONICET en el IGEVET - Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando N. Dulout” (UNLP-CONICET LA PLATA).
- **Epszteyn Sergio.** Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires). Magister en Microbiología (Universidad Hebreo de Jerusalén). Subgerente Operativo del Laboratorio de Investigación y Monitoreo de la Dirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- **Llamas Sergio.** Médico Veterinario (Universidad Nacional del Nordeste). Jefe de Oficina Local del Senasa en Formosa (2001-2012). Experiencia en industria frigorífica desde 2017. Jefe de Aseguramiento y Control de Calidad en Frigorífico Bermejo S.A., Pichanal, Salta, Argentina.

- **Locaso Belen.** Técnico en Higiene y Seguridad Alimentaria (Universidad Nacional del Litoral). Estudiante avanzada de la Licenciatura en Seguridad Alimentaria (Universidad Católica de Santa Fe). Experiencia en la industria frigorífica desde 2008. Laboratorio de la planta frigorífica Nelson FRIAR S.A.
- **Mariame Mariela.** Licenciada en Química (Universidad Nacional de La Pampa). Experiencia en la Industria frigorífica desde 2014. Jefe Control de Calidad en Sociedad Anónima Importadora y Exportadora de la Patagonia (SAIEP). La Anónima, Speluzzi, La Pampa.
- **Moredo Fabiana.** Médica Veterinaria y Doctora en Ciencias Veterinarias (FCV-UNLP). Docente de Microbiología en la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP).
- **Oteiza Juan Martín.** Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Mar del Plata). Doctor en Ciencias Exactas (Universidad Nacional de La Plata). Investigador del CONICET en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI).
- **Petrolí Sandra.** Licenciada en Química (Universidad Nacional del Litoral). Experiencia en la Industria frigorífica desde 2003. Gerente de Calidad en FRIAR S.A., Reconquista, Santa Fe, Argentina.
- **Restovich Viviana.** Bioquímica (Universidad Nacional de Rosario). Bromatóloga (UNR). Experiencia en la industria frigorífica desde 1996. Gerente de Control de Calidad y Director Técnico de Laboratorio de Frigorífico Arrebeef.
- **Senosiain Teresa.** Ingeniera en Alimentos (Universidad Nacional de Quilmes). Especialista en Calidad Industrial (Instituto Nacional de Tecnología Industrial). Especialista en Agronegocios y Alimentos (UBA). Experiencia en la industria frigorífica desde 2003. Gerente de calidad y Sustentabilidad de Marfrig Argentina.
- **Superno Valeria.** Bioquímica (Universidad Nacional de Rosario). Especialista en Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (UBA). Experiencia en la industria frigorífica desde 2006. Jefe de Laboratorio de Control de Calidad en Sociedad Anónima Importadora y Exportadora de la Patagonia (SAIEP). La Anónima, Salto, Buenos Aires.
- **Teitelbaum David.** Ingeniero Agrónomo. Experiencia en la industria frigorífica desde 1989. Responsable de Laboratorios y Microbiólogo de Referencia del Grupo Minerva Foods en Argentina.

# ÍNDICE

## CAPITULO I

Introducción ..... pág 8

## CAPITULO II

Marco normativo y laboratorios externos ..... pág 14

## CAPITULO III

Laboratorio de planta frigorífica ..... pág 40

## CAPITULO IV

Equipos, instrumentos, materiales y medios de cultivo ..... pág 56

## CAPITULO V

Criterios microbiológicos, planes de muestreo y recolección  
de muestras ..... pág 91

## CAPITULO VI

Métodos rápidos en microbiología de los alimentos ..... pág 124

## CAPITULO VII

Recuento de microorganismos indicadores ..... pág 132

## CAPITULO VIII

Detección de bacterias patógenas en carne bovina ..... pág 162

## CAPITULO IX

Monitoreo ambiental y su importancia en la industria alimenticia ..... pág 200

## CAPITULO X

Guía para análisis para calidad de agua potable ..... pág 226

## REFERENCIAS

..... pág 240

## ABREVIATURAS

..... pág 248

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

*David Teitelbaum<sup>1</sup> y Mariana Cap<sup>2,3</sup>*

<sup>1</sup>. Minerva Foods, Argentina.

<sup>2</sup>. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA),  
Instituto Tecnología de Alimentos.

<sup>3</sup>. Instituto de Ciencia y Tecnología de Sistemas  
Alimentarios Sustentables (UEDD INTA CONICET), Argentina.

La microbiología de los alimentos y, específicamente de la carne, es un campo fundamental para la inocuidad alimentaria. La verificación de los procesos de producción mediante análisis microbiológicos es un paso obligado para la liberación de productos destinados al consumo humano y animal. La información generada respecto de la ausencia/presencia de microorganismos patógenos o la evolución de microorganismos indicadores permite evaluar el riesgo de contaminación microbiana, implementar métodos para controlar su desarrollo y prevenir la propagación de enfermedades.

Según el Código Alimentario Argentino (CAA), se define a la **carne** como “la parte comestible de los músculos de los bovinos, ovinos, porcinos y caprinos declarados aptos para la alimentación humana por la inspección veterinaria oficial antes y después de la faena. La carne comprende a todos los tejidos blandos que rodean al esqueleto, incluyendo su cobertura grasa, tendones, vasos, nervios, aponeurosis y todos aquellos tejidos no separados durante la operación de la faena”.

Sus componentes mayoritarios, variables según la especie de origen, son agua (65-80%), proteína (16-22%) y grasa (1 a 15%). También se encuentran pequeñas cantidades de sustancias nitrogenadas no proteicas (aminoácidos libres, péptidos, nucleótidos), minerales de elevada biodisponibilidad, (hierro y zinc), vitaminas (B6, B12, retinol y tiamina), e hidratos de carbono. Aproximadamente el 40% de los aminoácidos que componen las proteínas de la carne son esenciales, lo que hace que este producto sea considerado como un alimento de elevado valor biológico. Estas características proporcionan un ambiente ideal para el desarrollo bacteriano. Previo a la faena, los tejidos comestibles de un animal sano se pueden considerar estériles, ya que se encuentran protegidos de la

contaminación bacteriana por el cuero, que funciona como una cubierta casi perfecta. Sin embargo, durante la faena los microorganismos presentes en el ambiente, en manos y utensilios, o en tejidos y otras superficies no estériles, pueden contaminarlos.

Los microorganismos de importancia en productos cárnicos pueden clasificarse en tres grupos: alteradores, indicadores y patógenos.

- **Microorganismos alteradores:** no causan enfermedades en los humanos, pero, como su nombre lo indica, alteran las características sensoriales de los alimentos, acortando su vida útil. Estos, se pueden clasificar en función de las condiciones de almacenamiento. En atmósferas con oxígeno, los principales responsables de la pérdida de calidad sensorial son los microorganismos aerobios, principalmente, bacterias del género *Pseudomonas* spp. Las alteraciones consisten, fundamentalmente, en el desarrollo de olores y sabores desagradables del tipo putrefactivo y la formación de limo superficial. En atmósferas sin oxígeno, los principales microorganismos alteradores son los anaerobios, fundamentalmente, bacterias ácido-lácticas. Las alteraciones que causan consisten en formación de exudados y el desarrollo de sabores y olores desagradables. Estos sabores y olores no deseados pueden ocurrir si no se respetaron ciertas condiciones como un adecuado pH de la carne al momento del envasado al vacío o temperaturas elevadas de almacenamiento durante la vida útil de las carnes refrigeradas.

- **Microorganismos indicadores:** su importancia radica en que se utilizan para conocer la calidad higiénico-sanitaria de la carne. Entre ellos, el recuento de microorganismos aeróbios mesófilos es utilizado para estimar de forma general la carga microbiana, ya que proporciona información con respecto a la existencia de prácticas

incorrectas. En cuanto al recuento de psicrótrofos se utiliza para predecir la vida útil de la carne en refrigeración. A su vez, los coliformes totales son un grupo de bacterias que se encuentran en el medio ambiente, incluyendo el tracto intestinal de los animales. El recuento de estas últimas se utiliza para evaluar la eficacia de los procesos operativos estandarizados de saneamiento (POES) y la posible contaminación pos-proceso. En este grupo de bacterias se encuentran los coliformes fecales y *Escherichia coli*, indicadores de contaminación fecal.

- **Microorganismos patógenos:** son aquellos capaces de causar enfermedades en humanos. Entre los microorganismos patógenos de relevancia en carne bovina se incluye a *Escherichia coli* productor de toxina Shiga, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo.

En la actualidad, se aplican métodos de conservación y aseguramiento de la inocuidad de la carne, los cuales se basan en el conocimiento de los factores que condicionan el desarrollo y la supervivencia de los microorganismos en la carne. Estos factores se clasifican en cuatro grupos.

- **Factores intrínsecos**, inherentes a la composición del alimento, como el pH, la actividad de agua y el potencial de óxido-reducción.

- **Factores extrínsecos**, relacionados con las condiciones del ambiente en el que se almacena la carne, incluyen la temperatura, el oxígeno y la humedad.

- **Factores implícitos**, inherentes al microorganismo, como su estado fisiológico y sus interacciones con otros microorganismos.

- **Factores de procesamiento**, los que son aplicados durante el procesamiento de la carne, como el calor, la irradiación y altas presiones hidrostáticas, entre otros.

## Los laboratorios en plantas frigoríficas

El Decreto 4238/68 en el punto 7.2 del capítulo VII establece que “Los establecimientos con Inspección Veterinaria Nacional deberán contar con un laboratorio capacitado para efectuar los exámenes químicos, físicos y bacteriológicos que se exigen en este Reglamento y los que el Senasa juzgue necesarios para garantizar la sanidad de los productos.” Si bien este capítulo es del año 1983 y está desactualizado a los requerimientos técnicos actuales, plantea la necesidad de la existencia de los laboratorios en las plantas.

Contar con un laboratorio en planta frigorífica permite la verificación analítica del plan de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) en las diferentes áreas operativas:

- Análisis de medias reses.
- Análisis de productos semielaborados.
- Análisis de productos terminados.
- Análisis de aditivos y suministros.
- Desarrollo de productos.
- Intervenciones especiales por fallas de fabricación, devoluciones, investigaciones microbiológicas, etc.
- Procedimientos POES del Establecimiento.
- Monitoreo ambiental.

Además, contar con un laboratorio en planta frigorífica permite:

- Reducir costos analíticos asociados al envío de muestras a un laboratorio externo.
- Procesar las muestras inmediatamente después de su recolección.
- Optimizar los tiempos de obtención de resultados y liberación de lotes de producción.
- Disponer de una mejor verificación de los procesos.
- Emitir Certificados de Análisis (COA) de acuerdo con los diferentes requerimientos de cada cliente.

## **Calidad en los resultados**

En un laboratorio de planta frigorífica siempre se deben otorgar garantías respecto de la calidad de los resultados. Un laboratorio de planta frigorífica puede trabajar bajo la Norma ISO 17025 y buenas prácticas de laboratorio sin estar acreditado. De este modo los resultados serán confiables para la verificación de los procesos de productos elaborados, liberación de lotes, inspecciones, desvíos y garantías ante clientes, entre otros requisitos. Esto no quita que si la empresa frigorífica decide acreditar el laboratorio bajo esta norma lo pueda hacer. En el capítulo II de este manual se abordan aspectos normativos para asegurar la calidad de los resultados analíticos e instituciones para la acreditación de laboratorios.

## **Diseño y capacidad analítica en un laboratorio en una planta frigorífica**

Para diseñar un laboratorio es necesario establecer claramente los alcances de este e identificar una edificación independiente de las áreas productivas. Las instalaciones deben ofrecer flexibilidad para adaptarse a nuevas tecnologías que requieran espacios diferentes.

El laboratorio puede establecerse para realizar análisis microbiológicos (re cuento de indicadores, detección de bacterias patógenas, determinación de vida útil, análisis de agua, monitoreo ambiental, entre otros), análisis fisicoquímicos e inclusive análisis de residuos veterinarios de productos y subproductos.

De estos objetivos dependerá el diseño del laboratorio, los equipos y materiales que se necesitan. En el capítulo III de este manual se analizan las premisas a considerar para el diseño de un laboratorio y en el capítulo IV se presentan los principales equipos a utilizar en un laboratorio de planta frigorífica. La preparación de material para la recolección de muestras es de

extrema importancia, como también lo es el diseño del muestreo, la recolección de muestras, su acondicionamiento y análisis o bien su remisión a laboratorios externos. En el capítulo V se aborda esta temática, con especial énfasis en análisis microbiológico. Sin embargo, en el laboratorio de planta frigorífica también se prepara el material, se organiza el muestreo y se acondicionan las muestras para análisis oficiales de residuos veterinarios, físico-químicos y agua. Si bien este manual está dirigido a microbiología, se incluyó un capítulo sobre normativa y requisitos comparados para análisis de agua según los principales destinos de productos y subproductos cárnicos (capítulo X).

Habitualmente en un laboratorio de planta frigorífica se requieren recuentos de indicadores y detección de patógenos para una pronta liberación de lotes de producción. Es recomendable utilizar métodos rápidos y evitar la implementación de metodologías tradicionales, ya que estas últimas requieren tiempo, formación calificada, registros, insumos y reactivos específicos, entre otros. En el capítulo VI, se presentan y analizan los métodos rápidos utilizados en laboratorios de plantas frigoríficas bovinas.

En el capítulo VII se abordan las metodologías y recomendaciones para realizar recuentos bacterianos de los principales indicadores sobre productos cárnicos bovinos y en el capítulo IX la utilización de recuentos en el monitoreo ambiental.

En el capítulo VIII se describen las principales metodologías para detección de patógenos. En este caso, el principal objetivo de un laboratorio de planta es identificar rápidamente las muestras negativas a los patógenos definidos en el plan APPCC, para ello se utilizan técnicas de screening o tamizaje. Cuando un resultado es positivo al screening, queda a criterio de la empresa confirmar el resultado o tomar una deci-

sión sobre el lote asumiendo ese resultado como positivo confirmado. En caso de decidir realizar una confirmación microbiológica mediante aislamiento bacteriano, puede ser recomendable enviar una muestra de ese lote a un laboratorio externo, tal como se describe en el capítulo V.

### Personal destinado a un laboratorio de planta frigorífica

El personal de laboratorio debe estar a cargo de un **profesional experto (Director Técnico)** que lidere todas las operaciones analíticas y que sea capaz de proveer los recursos necesarios para asegurar la calidad requerida por las operaciones que se desarrollen.

Además, es recomendable contar con los siguientes roles en el personal de un laboratorio de planta frigorífica:

- ✓ Supervisor de laboratorio: capaz de reemplazar el responsable del laboratorio en su ausencia.
- ✓ Analistas técnicos: capaces de realizar las determinaciones analíticas y que puedan llevar el control de insumos del laboratorio.
- ✓ Analistas idóneos: para realizar muestras de productos, preparar y esterilizar los materiales necesarios
- ✓ Personal auxiliar para asistir en tareas de limpieza de materiales y del laboratorio.

El entrenamiento y actualización permanente de todo el personal es vital para la confiabilidad de los resultados que suministra el laboratorio.

### Interpretación de resultados

Para una adecuada interpretación de resultados es necesario conocer la normativa nacional e internacional vigente, espe-

cialmente de los destinos donde se exportan productos y subproductos elaborados en la planta frigorífica. En los capítulos VII y VIII se incluyen tablas comparativas para facilitar la adecuada interpretación de resultados.

Es recomendable evitar la acumulación de resultados sin interpretación, ya que los resultados analíticos deben ser analizados con celeridad y conducir a una decisión, consecuencia o intervención sobre el proceso, el ambiente y/o el producto

Es conveniente mantener una rutina semanal, mensual, estacional y/o anual de análisis estadístico de los resultados obtenidos para poder interpretar tendencias.

### Laboratorios externos

Las muestras que deben ser derivadas a laboratorios externos son:

- Muestras oficiales.
- Muestras de rutina recolectadas en plantas que no tienen laboratorio.
- Muestras que el cliente requiere que los análisis sean realizados por un laboratorio acreditado.
- Análisis especiales que solo realizan laboratorios específicos.

Las muestras que pueden ser derivadas a laboratorios externos son:

- Muestras para confirmar resultados positivos a *screening* de patógenos.
- Muestras confirmadas de patógenos que requieran un ulterior análisis.

Para seleccionar un laboratorio externo al cual enviar muestras se recomienda considerar las siguientes condiciones:

- Acreditación bajo la Norma ISO 17025.
- Alcance para la metodología requerida.

- Autorización del Senasa para el análisis requerido.
- Celeridad para la entrega de los resultados.
- Información respecto de las metodologías, procedimientos y técnicas que utilizará para realizar los análisis solicitados.
- Plan de prevención del fraude (BRCGS vs9).
- Precio de los análisis.

En el capítulo II se presentan los laboratorios externos acreditados bajo ISO 17025 y autorizados por el Senasa para realizar análisis microbiológicos, fisicoquímicos y residuos para la industria frigorífica bovina.

#### **NOTA DEL EDITOR: premisas sobre el análisis microbiológico**

- Es necesario establecer claramente la finalidad y el alcance del análisis microbiológico.
- El análisis microbiológico no es de carácter preventivo.
- El análisis microbiológico no aumenta la calidad microbiológica del producto.
- El análisis microbiológico no otorga garantías absolutas sobre el lote de producción.
- El análisis microbiológico se aplica para verificación del proceso.
- El diseño y la aplicación de un muestreo para análisis microbiológico debe estar basado en una evaluación de riesgos.

## CAPÍTULO II

### MARCO NORMATIVO Y LABORATORIOS EXTERNOS

*Nicolas Marchionni y Silvana Següino*

Centro de Investigación y Asistencia Técnica  
a la Industria (CIATI), Villa Regina, Río Negro, Argentina

Una norma o estándar es un documento en el que se describen las condiciones mínimas que debe reunir un producto, proceso o servicio. El proceso de normalización es la actividad que tiene por objeto, crear estos documentos, y se lleva a cabo a través de comisiones o comités de estudio específicos para cada norma.

Las naciones tienen su propio organismo nacional de normalización, que genera sus normas. En Argentina este organismo es el IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación), fundado en 1935 por representantes del gobierno, la economía, e instituciones científico-técnicas. Fue el primer organismo de normalización creado en América Latina y el Poder Ejecutivo Nacional lo reconoció como tal en 1994.

A nivel internacional existen varias organizaciones de normalización. La más conocida es ISO (*International Organization for Standardization*), que fue creada en 1947 y reúne a los institutos de normalización nacionales de 164 países, incluido el IRAM.

Una de las normas creadas por ISO es la norma ISO/IEC 17025, en la cual que se establecen requisitos para los laboratorios de ensayo y calibración.

En Argentina se adoptó esta normativa como IRAM-ISO IEC 17025, y su versión vigente es la numero 1 emitida en el año 2017.

Si bien los laboratorios pueden funcionar sin aplicarla, la implementación obligatoria responde a las exigencias del mercado al que esté destinado el producto, proceso o servicio, y sus organismos reguladores intervenientes (nacionales y/o internacionales). El uso de la norma ISO/IEC 17025 por parte de los laboratorios puede ser voluntario u obligatorio (campo regulado).

---

En este capítulo analizaremos los siguientes componentes:

- A. Norma ISO/IEC 17025.
- B. Instituciones de acreditación.
- C. RedLab Senasa.
- D. Laboratorios externos.

## **A. NORMA ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.**

La Norma ISO/IEC 17025, contempla lineamientos para los procesos internos de gestión y para los procesos técnicos, con el fin de garantizar la fiabilidad de sus resultados y competencia técnica. El comité responsable de emitir esta norma la revisa cada 5 años. La última versión es la número 3 y fue emitida en 2017.

A continuación, se presenta un resumen de las consideraciones básicas que contempla la norma en cada requisito de gestión como técnico.

### **1. REQUISITOS GENERALES**

Cubre dos requisitos principales (imparcialidad y confidencialidad). El laboratorio debe garantizar que todo su personal mantenga la confidencialidad, y sea imparcial a la hora de informar resultados de ensayo. Aquí la imparcialidad hace referencia al hecho de que no existan conflictos de interés en las actividades del laboratorio, y la confidencialidad se refiere al tratamiento de la información relacionada a las actividades del laboratorio, incluyendo cualquier persona que pueda intervenir y conocer la misma.

### **2. REQUISITOS RELATIVOS A LA ESTRUCTURA**

Describe como debe ser la estructura organizativa básica del laboratorio y sus procesos. Para su cumplimiento, el laboratorio debe contar con la infraestructura o instalaciones convenientes garantizando así el adecuado desarrollo de la actividad.

### **3. REQUISITOS RELATIVOS A LOS RECURSOS**

En este apartado, se especifican los cinco componentes necesarios con los que debe contar un laboratorio para su funcionamiento.

- **Personal.** Se establecen requisitos necesarios en cuanto a la competencia del personal para realizar las actividades del laboratorio, la comunicación de sus tareas y responsabilidades, y también indica que se debe contar con procedimientos relacionados para determinar los requisitos de competencia, selección, formación, supervisión, autorización, y evaluación del personal.

- **Instalaciones y condiciones ambientales.** Es necesario que el laboratorio disponga de instalaciones que brinden las condiciones ambientales adecuadas para proceder con sus actividades, así como establecer medidas para su mantenimiento y conservación, para evitar imprevistos.

- **Equipamiento.** En este inciso se establece la necesidad de disponer o subcontratar los equipos necesarios que se requieran, o que pueden influir en los resultados, para asegurar el correcto desempeño de las actividades de laboratorio, además de disponer de medios adecuados para la conservación y mantenimiento de aquellos equipos cuyo deterioro tendría consecuencias negativas en la calidad del servicio.

- **Trazabilidad metrológica.** Este apartado establece que el laboratorio precisa contar con un procedimiento y un programa de calibración de equipos y patrones de referencia, ya sean equipos propios o subcontratados.

- **Productos y servicios suministrados externamente.** Aquí se indica que, a los proveedores y subcontratistas de productos y servicios que afectan a las actividades del laboratorio, se los debe seleccionar, evaluar y realizar un seguimiento de su desempeño mediante un procedimiento. Estos resultados deben quedar registrados.

## **4. REQUISITOS DEL PROCESO**

### **- Revisión de solicitudes, ofertas y contratos.**

Referido a los acuerdos con los clientes, se establece que el laboratorio debe contar con un procedimiento para la revisión de solicitudes, ofertas y contratos.

Mediante éste el laboratorio debe verificar que cuenta con la capacidad y los recursos para cumplir con lo solicitado por el cliente, y seleccionar los métodos o procedimientos adecuados. Cualquier diferencia entre la solicitud o la oferta y el contrato se debe resolver antes de que comiencen las actividades de laboratorio. Cada contrato debe ser aceptable tanto para el laboratorio como para el cliente. Si un contrato es modificado después de que el trabajo comenzó, se debe realizar la revisión del contrato y cualquier modificación se debe comunicar a todo el personal afectado. Estas revisiones deben quedar registradas.

### **- Selección, verificación y validación de métodos.**

En relación con la selección y verificación de métodos, se establece que se deben usar métodos y procedimientos apropiados para todas las actividades de laboratorio y, cuando sea apropiado, para la evaluación de la incertidumbre de medición, así como también las técnicas estadísticas para el análisis de datos. Esta documentación se debe mantener actualizada, fácilmente disponibles para el personal. Además, el laboratorio debe verificar que puede llevar a cabo apropiadamente los métodos antes de utilizarlos.

Respecto a la validación de métodos, se establece que el laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos desarrollados por el laboratorio y los métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto o modificados de otra forma. También se indica que, cuando

se hacen cambios a un método validado, se debe determinar la influencia de estos cambios, y cuando se encuentre que éstos afectan la validación inicial, se debe realizar una nueva validación del método. Los registros utilizados para la validación de métodos deben ser conservados.

### **- Muestreo.**

En caso de que el laboratorio lleve a cabo el muestreo, se indica que el mismo debe tener un plan y un método para asegurar la validez de los resultados. El plan y el método de muestreo deben estar disponibles en el sitio donde se lleva a cabo el muestreo. Siempre que sea razonable, los planes de muestreo deben basarse en métodos estadísticos apropiados. Además, el laboratorio debe conservar los registros de los datos de muestreo.

En caso de que se reciban muestras en el laboratorio, se debe tener en cuenta lo indicado en la manipulación de los ítems de ensayo o calibración.

### **- Manipulación de los ítems de ensayo o calibración.**

En este punto se menciona que el laboratorio debe contar con un procedimiento para el transporte, recepción, manipulación, protección, almacenamiento, conservación y disposición o devolución de los ítems de ensayo o calibración, incluidas todas las disposiciones necesarias para proteger la integridad del ítem de ensayo o calibración, y para proteger los intereses del laboratorio y del cliente. Se deben seguir las instrucciones de manipulación suministradas con el ítem.

También, se debe contar con un sistema para identificar sin ambigüedades los ítems de ensayo o de calibración. La identificación se debe conservar mientras el ítem esté bajo la responsabilidad del laboratorio, asegurando que no se confundan físicamente ni tampoco cuando se haga

referencia a ellos en registros o en otros documentos.

Si al recibir el ítem de calibración o ensayo, se evidencian desviaciones de las condiciones especificadas, estas deben quedar registradas.

#### **- Registros técnicos.**

En referencia a los registros técnicos (resultados, informe, factores que afectan al resultado, incertidumbre, fecha, identidad del personal responsable, observaciones), se establece la necesidad de asegurar que los mismos contengan información suficiente para facilitar la repetición de la actividad del laboratorio en condiciones lo más cercanas posibles a las originales. Los datos y los cálculos originales se deben registrar en el momento en que se hacen y deben identificarse con la tarea específica.

En caso de realizar modificaciones a los registros, las mismas deben ser trazables a las versiones anteriores o a las observaciones originales, indicando fecha de modificación, aspecto corregido y responsable.

#### **- Evaluación de la incertidumbre de medición.**

En este punto se establece que el laboratorio debe identificar las contribuciones a la incertidumbre de medición.

Para laboratorios de calibraciones (incluidas las de sus propios equipos), se debe evaluar la incertidumbre de medición para todas las calibraciones.

Para laboratorios de ensayos se debe evaluar la incertidumbre de medición, o en caso de que el método de ensayo no lo permita, se debe realizar una estimación basada en la comprensión de los principios teóricos o la experiencia práctica de la realización del método.

#### **- Aseguramiento de la validez de los resultados.**

El laboratorio debe contar con un procedimiento que incluya revisión de tendencias y técnicas estadísticas para la revisión de los resultados, para hacer el seguimiento de la validez de los resultados.

Se menciona también, que el laboratorio debe hacer seguimiento de su desempeño mediante comparación con los resultados de otros laboratorios, mediante la participación en ensayos de aptitud, o la participación en comparaciones interlaboratorios diferentes de ensayos de aptitud.

Los datos obtenidos de las actividades de seguimiento se deben analizar, y utilizar para controlar y mejorar las actividades del laboratorio. Si se detectan resultados fuera de los criterios predefinidos, se deben tomar las acciones apropiadas para evitar que se informen resultados incorrectos.

#### **- Informe de resultados.**

Aquí se establece que los resultados se deben revisar y autorizar antes de su liberación. Los resultados se deben suministrar de manera exacta, clara, inequívoca y objetiva, y deben incluir toda la información acordada con el cliente, la necesaria para la interpretación de los resultados y toda la información exigida en el método utilizado. Todos los informes emitidos se deben conservar como registros técnicos.

**Cada informe debe incluir**, al menos, la siguiente información (a menos que el laboratorio tenga razones válidas para no hacerlo):

- a. un título: “Informe de ensayo”, “Certificado de calibración” o “Informe de muestreo”;
- b. el nombre y la dirección del laboratorio;

- c. el lugar en que se realizan las actividades de laboratorio, incluso cuando se realizan en las instalaciones del cliente o en sitios alejados de las instalaciones permanentes del laboratorio, o en instalaciones temporales o móviles asociadas;
- d. una identificación única de que todos sus componentes se reconocen como una parte de un informe completo y una clara identificación del final;
- e. el nombre y la información de contacto del cliente;
- f. la identificación del método utilizado;
- g. una descripción, una identificación inequívoca y, cuando sea necesario, la condición del ítem;
- h. la fecha de recepción de los ítems de calibración o ensayo, y la fecha del muestreo, cuando esto sea crítico para la validez y aplicación de los resultados;
- i. las fechas de ejecución de la actividad del laboratorio;
- j. la fecha de emisión del informe;
- k. la referencia al plan y método de muestreo usados por el laboratorio u otros organismos, cuando sean pertinentes para la validez o aplicación de los resultados;
- l. una declaración acerca de que los resultados se relacionan solamente con los ítems sometidos a ensayo, calibración o muestreo;
- m. los resultados con las unidades de medición, cuando sea apropiado;
- n. las adiciones, desviaciones o exclusiones del método;
- o. la identificación de las personas que autorizan el informe;
- p. una identificación clara cuando los resultados provengan de proveedores externos.

**Los datos suministrados por el cliente deben ser claramente identificados**, se debe incluir un descargo de responsabilidad cuando la información sea proporcionada por el cliente y la misma pueda afectar la validez de los resultados. Además, cuando el laboratorio no fue responsable de la etapa de muestreo, se debe indicar que los resultados se aplican a la muestra cómo se recibió.

**Cuando sea necesario para la interpretación de los resultados del ensayo, los informes deben incluir lo siguiente:**

- a. información sobre las condiciones específicas del ensayo, tales como condiciones ambientales.
- b. cuando sea pertinente, una declaración de conformidad con los requisitos o especificaciones.
- c. cuando sea aplicable, la incertidumbre de medición presentada en la misma unidad que el mensurando o en un término relativo al mensurando.
- d. cuando sea apropiado, opiniones e interpretaciones.
- e. información adicional que pueda ser requerida por métodos específicos, autoridades, o clientes.

Además de los requisitos mencionados, **los certificados de calibración deben incluir lo siguiente:**

- a. la incertidumbre de medición del resultado de medición presentado en la

- misma unidad que la de la unidad del mensurando o en un término relativo a dicha unidad.
- b. las condiciones en las que se hicieron las calibraciones, que influyen en los resultados de medición.
  - c. una declaración que identifique cómo las mediciones son trazables metrológicamente.
  - d. los resultados antes y después de cualquier ajuste o reparación, si están disponibles.
  - e. cuando sea pertinente, una declaración de conformidad con los requisitos o especificaciones.
  - f. cuando sea apropiado, opiniones e interpretaciones.
- También se menciona que un certificado o etiqueta de calibración no debe contener recomendaciones sobre el intervalo de calibración, excepto cuando así se haya acordado con el cliente.
- Cuando el laboratorio es responsable de la actividad de muestreo, los informes deben incluir lo siguiente:**
- a. la fecha del muestreo.
  - b. la identificación única del ítem o material sometido a muestreo (incluido el nombre del fabricante, el modelo o tipo de designación y los números de serie, según sea apropiado).
  - c. la ubicación del muestreo, incluido cualquier diagrama, croquis o fotografía.
  - d. una referencia al plan y método de muestreo.
  - e. los detalles de cualquier condición ambiental durante el muestreo, que afecte a la interpretación de los resultados.
- f. la información requerida para evaluar la incertidumbre de medición para ensayos o calibraciones subsiguientes.
- En el caso que se proporcione en el informe una declaración de conformidad con una especificación o norma, el laboratorio debe documentar la regla de decisión aplicada.**
- De indicar opiniones e interpretaciones en los informes, estas se deben basar en los resultados obtenidos del ítem ensayado o calibrado y se deben identificar claramente como tales.
- De ser necesario cualquier cambio en los informes ya emitidos, se debe realizar en forma de otro documento, y el cambio debe estar identificado claramente, y cuando sea apropiado, se debe incluir en el informe la razón del cambio.
- Quejas.** En este inciso se indica que el laboratorio debe contar con un procedimiento para recibir, evaluar y tomar decisiones acerca de las quejas. Siempre que sea posible, el laboratorio debe dar acuse de recibo de la queja y debe facilitar a quien presenta la queja, los informes de progreso y del resultado del tratamiento de la queja. Además, siempre que sea posible, el laboratorio debe notificar formalmente a quien presenta la queja, el cierre del tratamiento.
- Trabajo no conforme.** El laboratorio debe contar con un procedimiento para cuando cualquier aspecto de las actividades del laboratorio o sus resultados no cumplan con sus propios procedimientos o con los requisitos acordados con el cliente. A su vez, debe conservar registros del trabajo no conforme y las acciones relacionadas. Cuando la evaluación indique que el trabajo no conforme podría volver a ocurrir, el laboratorio debe implementar acciones correctivas.

**- Control de los datos y gestión de la información.** El laboratorio debe tener acceso a la información necesaria para llevar a cabo sus actividades. Los sistemas de gestión de la información del laboratorio que sean utilizados para recopilar, procesar, registrar, informar, almacenar o recuperar datos se deben validar en cuanto a su funcionalidad. El sistema de gestión de la información del laboratorio debe estar protegido contra acceso no autorizado, salvaguardando contra manipulación indebida y pérdida, ser mantenido para asegurar la integridad de los datos y de la información, e incluir un registro de fallos y acciones inmediatas y correctivas.

## 5. REQUISITOS DEL SISTEMA DE GESTIÓN

El laboratorio debe establecer y mantener un sistema de gestión de acuerdo con los requisitos de la Norma ISO 9001, y demostrar el cumplimiento coherente de los requisitos establecidos en la norma ISO/IEC 17025. El laboratorio debe establecer, implementar, documentar y mantener un sistema de gestión que incluya:

**- Documentación del sistema de gestión.** La dirección del laboratorio debe establecer, documentar y mantener políticas y objetivos, asegurándose que se entiendan e implementen en todos los niveles de la organización. Se debe garantizar el acceso al personal involucrado en actividades de laboratorio a la documentación del sistema de gestión e información relacionada, que sea aplicable a sus responsabilidades.

**- Control de documentos del sistema de gestión.** El laboratorio debe controlar los documentos (internos y externos) relacionados con el cumplimiento de esta norma. Para ello, debe asegurarse de que se aprueben en cuanto a su adecuación antes de su emisión, por personal autorizado, que se revisen periódicamente, y se actualicen, según sea necesario; que se identifiquen los

cambios y el estado de revisión actual de los documentos; que las versiones vigentes estén disponibles en los puntos de uso, que se controle su distribución; que estén identificados inequívocamente, que se prevenga el uso de documentos obsoletos.

**- Control de registros.** Se debe establecer y conservar registros legibles. Además, se deben implementar los controles necesarios para la identificación, almacenamiento, protección, copia de seguridad, archivo, recuperación, tiempo de conservación y disposición de sus registros.

**- Acciones para abordar los riesgos y oportunidades.** El laboratorio debe considerar los riesgos y las oportunidades asociados con sus actividades, planificar acciones para abordarlos, y verificar su eficacia.

**- Mejoras.** El laboratorio debe identificar y seleccionar oportunidades de mejora e implementar cualquier acción necesaria. Estas oportunidades de mejora pueden partir de fuentes internas (procedimientos operacionales, el uso de las políticas, los objetivos generales, los resultados de auditoría, las acciones correctivas, la revisión por la dirección, las sugerencias del personal, la evaluación del riesgo, el análisis de datos, y los resultados de ensayos de aptitud) como de fuentes externas (retroalimentación, tanto positiva como negativa, de sus clientes).

**- Acciones correctivas.** Cuando ocurre una no conformidad, el laboratorio debe reaccionar emprendiendo acciones para controlarlas y corregirlas, evaluar acciones para eliminar su causa, revisar la eficacia de esas acciones, y estos registros se deben conservar.

**- Auditorías internas.** Se deben llevar a cabo auditorías internas a intervalos planificados para evaluar si el sistema de gestión se implementa y mantiene eficazmente. El laboratorio debe contar con un programa de auditoría, que incluya la frecuencia, los

métodos, las responsabilidades, los requisitos de planificación y presentación de informes, definir los criterios y alcance de cada auditoría, informar los resultados a la dirección pertinente, implementar acciones correctivas, y estos registros se deben conservar.

**- Revisiones por la dirección.** La dirección del laboratorio debe revisar su sistema de gestión a intervalos planificados, con el fin de asegurar su conveniencia, adecuación y eficacia, incluidas las políticas y objetivos.

## B. INSTITUCIONES DE ACREDITACION

La implementación de normas en el campo voluntario puede realizarse a través de la adopción de sus lineamientos, sin ser necesario un reconocimiento oficial. Sin embargo, en el campo regulado, su implementación se debe verificar a través de certificados emitidos por organismos debidamente habilitados.

En este punto **no se debe confundir acreditación con certificación**. Si bien estos procesos comparten similitudes, la acreditación es el resultado de una evaluación más exhaustiva que la certificación.

**La certificación** es una actividad donde se evalúa si una empresa, producto, servicio o persona cumple con ciertos requisitos especificados para realizar una función. Esta evaluación está dirigida a los procesos y gestión de la organización, y es llevada a cabo por una tercera parte debidamente autorizada (diferente del proveedor y el cliente) denominada Organismos de Certificación. La certificación asegura al cliente que el producto o los servicios ofrecidos por una empresa cumplen con los requisitos establecidos (en la norma).

**La acreditación**, es el proceso por el cual una institución u organismo compe-

tente, denominado Organismo de Acreditación, legitima la competencia técnica de una organización para prestar un servicio o proporcionar un producto. A diferencia de la certificación, en la acreditación se realizan pruebas de capacidad técnica a fin de comprobar que la empresa es capaz de realizar lo que se dispone a hacer.

A su vez, la certificación puede ser otorgada por numerosos organismos de certificación. Mientras que la acreditación solo puede ser otorgada en cada país por un único organismo de acreditación (público o privado) reconocido internacionalmente.

## ORGANISMOS INTERNACIONALES DE ACREDITACIÓN

### Organismos Regionales

Las organizaciones acreditadoras deben a su vez estar acreditadas, por lo tanto existen entidades regionales que acreditan a las organizaciones acreditadoras nacionales.

Para Argentina, el organismo regional correspondiente es la Cooperación Inter Americana de Acreditación (IAAC). Esta es una asociación regional de organismos de acreditación y otras organizaciones, que evalúan y reconocen la competencia de los organismos de acreditación en las Américas. A su vez, IAAC es un Organismo de Cooperación Regional reconocido por ILAC e IAF.

### Organismos internacionales

**- Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC).** Es la organización internacional para organismos de acreditación que operan bajo la ISO/IEC 17011 y que participan en la acreditación de organismos de evaluación de conformidad, incluyendo laboratorios de calibración (que utilizan ISO/IEC 17025), laboratorios de ensayos (que utilizan ISO/IEC 17025), laboratorios clínicos (que uti-

Tabla 1. Organismos de Cooperación Regional reconocidos por ILAC.

REGIÓN	ORGANISMO
América	IACC - Cooperación Inter Americana de Acreditación
Europa	EA - Cooperación Europea para la Acreditación
Asia-Pacífico	APAC - Cooperación de Acreditación de Asia y el Pacífico
África	AFRAC - Cooperación Africana de Acreditación
Sur de África	SADCA - Cooperación de la Comunidad de Desarrollo de África Meridional en Acreditación
Región árabe	ARAC - Cooperación Árabe de Acreditación

lizan ISO 15189) y organismos de inspección (que utilizan ISO/IEC 17020).

- **Foro Internacional de Acreditación (IAF).** Es una asociación mundial de organismos de acreditación y otros organismos interesados en la evaluación de la conformidad en los campos de sistemas de gestión, productos, procesos, servicios, personal, validación y verificación y otros programas similares de evaluación de la conformidad, con el fin de lograr objetivos comunes de facilitación del comercio.

- **Acuerdos de reconocimiento.** Debido al gran movimiento actual del comercio internacional, y la necesidad de demostrar competencia técnica y operacional, los reconocimientos internacionales son esenciales.

El principio que persiguen las organizaciones internacionales acreditadoras es “*Evaluado una vez, aceptado en cualquier parte*”. Para facilitar la validez internacional de los certificados existen acuerdos de reconocimiento, en el marco de una organización mayor. Por ejemplo, si se desea insertar un producto o servicio en algún país, y su organismo de acreditación es firmante de un acuerdo multilateral, el informe o certificado emitido en el país de origen (avalado por la entidad acreditadora nacional) resultará tan confiable como los emitidos bajo la propia acreditación del país de destino.

Los Acuerdos de Reconocimiento son convenios entre los organismos de acreditación mediante el cual reconocen las acreditaciones emitidas entre sí. Dicho sistema de reconocimiento mutuo de acreditaciones se basa en el correcto funcionamiento de los sistemas de acreditación de los organismos que se suman al convenio.

La IAAC fue aceptada como Organismo de Cooperación Regional signatario del Acuerdo de Reconocimiento Mutuo (MRA) de ILAC, para los alcances de Laboratorios de Ensayo y Calibración (bajo ISO/IEC 17025) a partir de noviembre de 2006.

Además, IAAC fue aceptado como Organismo de Cooperación Regional signatario del Acuerdo de Reconocimiento Multilateral (MLA) de IAF, para el alcance principal de los Organismos de Certificación de Sistemas de Gestión (según ISO/IEC 17021-1) con sub-ámbitos para Sistemas de Gestión de Calidad (QMS), Sistemas de Gestión Ambiental (EMS), Sistemas de Gestión de Seguridad Alimentaria (FSMS), Sistemas de Gestión de Seguridad de la Información (ISMS), Sistemas de Gestión de Dispositivos Médicos (MDMS), Sistemas de Gestión de Energía (EnMS) y Sistemas de Gestión de Seguridad y Salud Ocupacional (OH&SMS), entre el año 2006 y el 2020.

Todos los países miembros de IAAC, ILAC e IAF deben promover la aceptación de los resultados de evaluación de la conformidad acreditados y considerarlos equivalentes a los resultados emitidos por sus propios entes acreditados, cuando están dentro del alcance del MLA/MRA suscrito.

**Tabla 2. Países y Organismos de Acreditación.**

<b>PAÍS</b>	<b>ORGANISMOS DE ACREDITACIÓN</b>
Alemania	Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH - DAkkS
Argentina	Organismo Argentino de Acreditación - OAA
Australia y Nueva Zelanda	JAS-ANZ
Austria	Bundesministerium f. Digitalización u. Wirtschaftsstandart
Bélgica	Organización Belga de Acreditación - BELAC
Brasil	INMETRO
Chipre	Organización de Chipre para la Promoción de la Calidad - CYS-CYSAB
Colombia	Organismo Nacional de Acreditación de Colombia - ONAC
Costa Rica	Ente Costarricense de Acreditación - ECA
Dinamarca	DANAK
Ecuador	Servicio Ecuatoriano de Acreditación - SAE
Egipto	Consejo de Acreditación de Egipto - EGAC
Eslovenia	Acreditación eslovena- SA
España	Entidad nacional de Acreditación - ENAC
Estados Unidos de América	Instituto Nacional Estadounidense de Estándares - ANSI
Estados Unidos de América	IOAS Inc. (IOAS)
Estados Unidos de América	Servicio de Acreditación Internacional - IAS
Finlandia	El Servicio de Acreditación de Finlandia - FINAS
Francia	Comité Francés de Acreditación - COFRAC
Grecia	Sistema Helénico de Acreditación SA - ESYD
India	Junta Nacional de Acreditación de Organismos de Certificación (NABCB)
Indonesia	Komite Akreditasi Nasional (Organismo Nacional de Acreditación de Indonesia) - KAN
Irlanda	Junta Nacional de Acreditación de Irlanda - INAB
Italia	Sistema Nacional de Acreditación - ACCREDIA
Japón	Junta de Acreditación de Japón - JAB
México	Entidad Mexicana de Acreditación, ac - EMA
Noruega	Acreditación noruega - NA
Países Bajos	Consejo Holandés de Acreditación - RvA
Pakistán	Consejo Nacional de Acreditación de Pakistán - PNAC
Perú	Instituto Nacional de la Calidad - Dirección de Acreditación - INACAL-DA
Polonia	Centro Polaco de Acreditación - PCA
Porcelana	CNAS
Portugal	IPAC
Reino Unido	Servicio de Acreditación del Reino Unido - UKAS
República Checa	Instituto Checo de Acreditación - CAI
República de Corea	Esquema de acreditación de laboratorios de Corea - KOLAS
República de Kazajstán	Centro Nacional de Acreditación - NCA
Sudáfrica	Sistema Nacional de Acreditación de Sudáfrica - SANAS
Suecia	Junta sueca para la evaluación de la conformidad y la acreditación - SWEDAC
Suiza	Servicio Suizo de Acreditación - SAS
Tailandia	Consejo Nacional de Normalización de Tailandia - NSC
Taiwán / Taipei Chino	Fundación de Acreditación de Taiwán - TAF
Uruguay	Organismo Uruguayo de Acreditación - OUA
Vietnam	Oficina de Acreditación - BoA

## **ORGANISMO ARGENTINO DE ACREDITACIÓN**

El Organismo Argentino de Acreditación (OAA) es una asociación civil sin fines de lucro, constituida el 29 de mayo de 1995. Este organismo fue reconocido y habilitado como Organismo de Acreditación, a partir de un convenio suscripto con la Secretaría de Industria de la Nación, en su carácter de autoridad de aplicación. Además, de acuerdo con lo dispuesto en el Decreto del Poder Ejecutivo Nacional N° 1474/94, se estableció que el OAA es el único actor nacional en el campo de la Acreditación.

El OAA es firmante de acuerdos de reconocimiento mutuo con organismos extranjeros (ILAC, IAF e IAAC), y lleva a cabo inspecciones de monitoreo de la conformidad con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) en los ámbitos que le sean delegados por las autoridades regulatorias correspondientes.

Muchos países en el mundo cuentan con regulaciones que requieren, para la autorización de la comercialización de productos o servicios en el ámbito de sus territorios nacionales, la acreditación obligatoria de los organismos de certificación, de inspección y/o laboratorios de ensayo.

### **C. REDLAB Senasa**

El Senasa es un organismo de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca del Ministerio de Economía de la Nación, encargado de ejecutar las políticas nacionales en materia de sanidad y calidad animal y vegetal e inocuidad de los alimentos de su competencia, así como de verificar el cumplimiento de la normativa vigente en la materia.

También es de su competencia el control del tráfico federal y de las importaciones y exportaciones de los productos, subproductos y derivados de origen animal

y vegetal, productos agroalimentarios, fármaco-veterinarios y agroquímicos, fertilizantes y enmiendas.

En síntesis, el Senasa es responsable de planificar, organizar y ejecutar programas y planes específicos que reglamentan la producción, orientándola hacia la obtención de alimentos inocuos para el consumo humano y animal.

Para ello cuenta con laboratorios especializados en controles analíticos relacionados con la sanidad animal y vegetal, la inocuidad alimentaria y la calidad de productos, subproductos e insumos agropecuarios.

La Red Nacional de Laboratorios del Senasa (RedLab) es un conjunto de laboratorios de carácter público o privado autorizados por el Senasa para la realización de ensayos y emisión de resultados con reconocimiento oficial.

Los laboratorios debidamente inscriptos en la RedLab, son los únicos autorizados para realizar ensayos sobre muestras oficiales y desde el Senasa se realizan auditorías a los laboratorios de la RedLab de todo el país.

La RedLab se creó a través de la Resolución de la Ex Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA) N° 736/2006.

En su artículo 2º se establece que los laboratorios que soliciten la inscripción a la red podrán optar por hacerlo en una de las siguientes categorías: “autorizados” o “reconocidos”.

**Los laboratorios reconocidos** deben cumplir con requisitos de buenas prácticas de laboratorio.

**Los laboratorios autorizados** deben

acreditar sus ensayos según la norma ISO/IEC 17025. Para ello sólo se reconocerán acreditaciones realizadas por el OAA u otros Organismos de Acreditación firmantes de los Acuerdos de Reconocimiento Multilateral (MLA) de la Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC).

En el anexo 1 de este capítulo se presenta la lista de laboratorios autorizados por el Senasa para análisis de productos cárnicos y agua. También se incluye el alcance acreditado por instituciones nacionales e internacionales.

## D. LABORATORIOS EXTERNOS

Los laboratorios externos son aquellos externos a la planta frigorífica.

Dentro de estos podemos mencionar laboratorios contratados por la planta frigorífica que actúan para dar cumplimiento a las solicitudes que reciban, y también laboratorios que actúan bajo regulaciones de mercado, con el fin que su resultado sea comparado frente a requisitos normativos o legales.

Según el punto de vista del usuario final de los resultados de ensayo o calibración, se puede mencionar tres tipos de laboratorios:

- **Laboratorios de primera parte.** Son laboratorios internos. Los resultados que emiten son utilizados por la misma planta frigorífica a la que pertenecen, principalmente como control de calidad interno.

- **Laboratorios de segunda parte.** Son laboratorios externos que no forman parte de la planta frigorífica que requiere el ensayo (usuario final), pero que están vinculados a ella, y siguen los lineamientos de trabajo

que le sean solicitados. Los resultados que estos obtienen son utilizados para la toma de decisiones en una relación cliente-proveedor.

- **Laboratorios de tercera parte.** Son laboratorios externos que no tienen interés en los resultados, es decir, son independientes de la planta frigorífica que proporciona el ítem a ensayar o calibrar, y también de los intereses del usuario final. La finalidad de este tipo de laboratorios es aportar la mayor independencia posible a los resultados obtenidos.

Ahora bien, los laboratorios tanto internos como externos, pueden actuar al mismo tiempo como laboratorios de primera, segunda y tercera parte, dependiendo siempre de quien sea el usuario final de sus resultados, es decir pueden mantener más de una relación comercial a la vez.

## AUDITORÍAS PRIVADAS A LABORATORIOS EXTERNOS

A través de una relación comercial cliente-proveedor, se pueden establecer condiciones a cumplir por ambas partes, siendo la evaluación de proveedores una de las principales actividades.

Los proveedores de ensayos o calibraciones (laboratorios externos) y sus subcontratistas (proveedores de productos o servicios del laboratorio externo), son susceptibles de recibir evaluaciones por parte de sus clientes para asegurarse que cumplen con los requisitos establecidos en el contrato, y que los procesos siguen las normas y estándares aplicables. Estas evaluaciones las puede realizar el propio cliente o una entidad externa en su nombre, siendo el proceso de auditoría, una de las herramientas principales para realizar esta evaluación.

A su vez, las auditorías a los laboratorios pueden ser llevadas a cabo por en-

tidades regulatorias para mantener su habilitación o por las propias organizaciones acreditadoras para mantener dicha acreditación.

La auditoría es el proceso sistemático, independiente y documentado para obtener evidencias objetivas y evaluarlas con el fin de determinar el grado en que se cumplen los criterios de auditoría.

Los criterios de auditoria son el conjunto de requisitos usados como referencia frente a la cual se compara la evidencia objetiva. Estos pueden ser externos como requisitos establecidos en normas, legislaciones, reglamentaciones, y/o contratos, y también internos como instrucciones de trabajo, procedimientos, etc.

La importancia del proceso de auditoría va a depender del grado de interés que posea la organización auditada. Superar o no superar satisfactoriamente un proceso de auditoría interna, va a impactar puertas adentro en la organización de distintas maneras, pero en cambio si la auditoria es externa, el buen desempeño en esa actividad puede ser crucial dependiendo de cuál sea el alcance de esta.

Las auditorias pueden clasificarse en:

**Auditorias de primera parte:** son auditorías internas, efectuadas por el personal propio de la empresa (u otros en su nombre).

**Auditorias de segunda parte:** son auditorías externas realizadas por las empresas (u otros en su nombre) que tienen un interés propio en la organización auditada; por ejemplo, los clientes a sus proveedores.

**Auditorias de tercera parte:** son las auditorías realizadas por entidades independientes a la empresa auditada, como organismos de acreditación, de certificación y entidades regulatorias, con el fin de otorgar

reconocimiento legal, certificación o habilitación reglamentaria.

Independientemente de cuál sea el tipo de auditoría y del tamaño y tipo de empresa, los lineamientos para realizar esta actividad se establecen en la norma ISO 19011.

Dentro de estos lineamientos, se encuentra descrito como debe ser la planificación de la auditoría, es decir, el plan del día o días en que se va a realizar la actividad.

El grado de detalle y el contenido de la planificación de la auditoría pueden diferir; por ejemplo, entre la auditoría inicial y las posteriores, así como entre las auditorías internas y externas. La planificación de la auditoría debería ser lo suficientemente flexible para permitir cambios a medida que las actividades de auditoría se vayan llevando a cabo.

La planificación de la auditoría debería tener en cuenta, según sea apropiado:

- la identificación de los representantes del auditado en la auditoría;
- el idioma de trabajo y del informe de la auditoría, cuando sea diferente del idioma del auditor o del auditado, o ambos;
- los temas del informe de la auditoría;
- los preparativos logísticos y de comunicaciones, incluyendo los preparativos específicos para las ubicaciones que se van a auditar;
- las acciones específicas para abordar los riesgos en el logro de los objetivos de la auditoría y las oportunidades que surjan;
- los temas relacionados con la confidencialidad y la seguridad de la información;

- las acciones de seguimiento de una auditoría previa u otras fuentes.
- las actividades de seguimiento de la auditoría planificada;
- la coordinación con otras actividades de auditoría, en el caso de una auditoría conjunta.

Los planes de auditoría deben presentarse a quien va a ser auditado. Cualquier cuestión sobre los planes de auditoría debería resolverse entre el líder del equipo auditor, el auditado y, si fuera necesario, las personas responsables de la gestión del programa de auditoría.

## INTERLABORATORIOS

Una de las principales herramientas con las que cuentan los laboratorios para asegurar la validez de sus resultados es su participación en “ensayos de aptitud”.

La participación en ensayos de aptitud permite al laboratorio demostrar su aptitud técnica, evaluar sus métodos de medición y calibración, comparar resultados con sus pares; y evaluar así su desempeño, permitiendo asegurar la calidad de las mediciones.

Por ello la norma ISO/IEC 17025 incluye como un requisito la participación de los laboratorios en estos ensayos. En su ítem 7.7.2 dice:

“El laboratorio debe hacer seguimiento de su desempeño mediante comparación con los resultados de otros laboratorios, cuando estén disponibles y sean apropiados. Este seguimiento se debe planificar y revisar y debe incluir, pero no limitarse a, una o ambas de las siguientes:

- Participación en ensayos de aptitud.

- Participación en comparaciones interlaboratorios diferentes de ensayos de aptitud”.

La norma que establece los lineamientos para la realización de los Ensayos de Aptitud es la norma ISO 17043 “Evaluación de la conformidad- Requisitos generales para los ensayos de aptitud”.

A través de la adopción de sus lineamientos los organizadores de interlaboratorios pueden realizar ensayos de aptitud, sin ser necesario un reconocimiento oficial de cumplimiento con esta norma.

Sin embargo, en el campo regulado (oficial), su implementación por parte de los organizadores de la actividad se debe verificar a través de certificados emitidos por organismos de acreditación habilitados (OAA en Argentina).

A su vez, este servicio puede ser provisto por entidades nacionales o internacionales.

A través de IAAC, los proveedores regionales acreditados para realizar ensayos de aptitud están integrados en EPTIS (*European Proficiency Test Information System*), facilitando así el acceso a información sobre los programas disponibles en la región.

El EPTIS fue un proyecto de la Unión Europea que tenía como objetivo hacer un inventario de los esquemas de ensayos de aptitud regularmente operados en los países participantes. Esta base de datos fue establecida en el año 2000, agrupando inicialmente a proveedores de ensayos de aptitud de 16 países de Europa y actualmente dispone de un registro de más de 800 programas de Europa y otras regiones.

Según la norma ISO 17043 la comparación interlaboratorios es la organización,

realización y evaluación de mediciones o ensayos sobre el mismo ítem o ítem similares, aplicado a dos o más laboratorios de acuerdo con condiciones predeterminadas.

En cambio, en los ensayos de aptitud hay un tercero que actúa de coordinador de la actividad, garantizando imparcialidad e independencia. Este laboratorio organizador funciona como referencia, lo que sirve para establecer el desempeño de los laboratorios que participan. Es decir, los ensayos de aptitud son un caso particular de comparaciones interlaboratorios.

Como resultado de la participación en ensayos de aptitud, cada laboratorio obtiene un indicador numérico que señala si el laboratorio tuvo o no un desempeño satisfactorio. Un resultado satisfactorio permite al laboratorio demostrar y asegurar la validez de sus resultados.

Existen diversas clasificaciones de los ensayos de aptitud, una de ellas es la siguiente:

**- Cuantitativos:** el objetivo es evaluar una o varias magnitudes relacionadas con la medición de un ítem de ensayo en donde el resultado es un valor numérico con su respectiva unidad. El establecimiento del valor de referencia se puede lograr a través de un valor por consenso o un valor previamente determinado por el proveedor del ensayo de aptitud.

**- Cualitativos:** el objetivo es describir una o más características de un ítem y se comunican en una escala de categorías u orden. Se busca evaluar la competencia del laboratorio para detectar la presencia o ausencia de características del ítem.

**- Interpretativos:** el objetivo es evaluar una característica descrita por parte del participante. A través de la participación en ensayos de aptitud el laboratorio puede identificar oportunidades de mejora y esta-

blecer las acciones pertinentes para lograr resultados acordes con su propósito. Para los laboratorios de ensayo y calibración la participación en un ensayo de aptitud tiene las siguientes etapas:

- Selección del ensayo de aptitud.
- Inscripción.
- Recepción del ítem de ensayo.
- Medición del ítem de comparación.
- Reporte de los resultados.
- Análisis de la información.
- Implementación de mejoras de los procesos de medición (para aquellos que han obtenido desempeños no satisfactorios o cuestionables).

Algunas recomendaciones para la selección de los ensayos de aptitud pueden ser el alcance del ensayo, intervalo de medición, unidades de expresión de resultados, indicadores de desempeño, equivalencia de ensayos de aptitud, frecuencia de participación, estabilidad de las muestras, técnica de medición (si aplica), condiciones de envío de muestras, aduanas o restricciones legales en el ingreso o movilidad de las muestras en el país (si aplica), etc.

## SELECCIÓN DE UN LABORATORIO EXTERNO

Al considerar la contratación de un laboratorio externo (como proveedor o para subcontratar ensayos), la planta frigorífica puede establecer ciertos requisitos a cumplir, las que junto con las responsabilidades de cada parte deben confirmarse por escrito antes de iniciar el proceso.

Es importante considerar el costo-beneficio, evaluar la calidad de los servicios ofrecidos y la reputación del laboratorio antes de tomar una decisión.

Son varios los aspectos a tener en cuenta a la hora de seleccionar el laboratorio adecuado. Existe un gran número de laboratorios, la cuestión es cómo encontrar el que más se ajusta a nuestras necesidades.

Desde luego hay que enfocar la búsqueda a aquellos que tengan la capacidad analítica. Esto incluye equipamiento e insu-  
mos adecuados, personal calificado y con-  
tar con un robusto sistema de gestión de  
calidad. Además, es importante tener en  
cuenta la trayectoria y la experiencia de-  
mostrada por el laboratorio. Por otro lado,  
se debe asegurar que genere resultados  
confiables.

Un laboratorio acreditado en la norma ISO/IEC 17025 ofrece sin duda resulta-  
dos confiables, asegurando la trazabilidad  
de toda la cadena productiva, desde el in-  
greso del ítem de ensayo o calibración, su  
distribución a los sectores donde se van a  
llevar a cabo los análisis, el material de re-  
ferencia empleado, las calibraciones de los  
equipos, la revisión de datos por la super-  
visión, hasta la emisión del resultado final.

Un laboratorio acreditado bajo esta  
norma adquiere reconocimiento interna-  
cional independientemente del país emisor  
del certificado.

Es importante aclarar que el laborato-  
rio puede no acreditar todo su alcance. En  
el certificado otorgado por el organismo de  
acreditación se especifica dicho alcance  
(Traitemberg, 2020).

La norma ISO/IEC 17025 en el pun-  
to 6.6 Productos y servicios suministrados  
externamente, establece lo siguiente,

**6.6.1.** El laboratorio debe asegurarse de  
que los productos y servicios suministra-  
dos externamente, que afectan a las acti-  
vidades del laboratorio, sean adecuados y  
utilizados únicamente cuando estos pro-  
ductos y servicios:

- a. están previstos para la incorporación a  
las actividades propias de laboratorio;
- b. se suministran, parcial o totalmente, di-  
rectamente al cliente por el laboratorio,

como se reciben del proveedor externo;

- c. se utilizan para apoyar la operación del  
laboratorio.

**6.6.2.** El laboratorio debe contar con un  
procedimiento y conservar registros para:

- a. definir, revisar y aprobar los requisitos  
del laboratorio para productos y servi-  
cios suministrados externamente;
- b. definir los criterios para la evaluación,  
selección, seguimiento del desempeño  
y reevaluación de los proveedores ex-  
ternos;
- c. asegurar que los productos y servicios  
suministrados externamente cumplen  
los requisitos establecidos por el labo-  
ratorio, o cuando sean aplicables, los  
requisitos pertinentes de este docu-  
mento, antes de que dichos productos  
o servicios se usen o se suministren al  
cliente;
- d. emprender cualquier acción que surja  
de las evaluaciones, del seguimiento  
del desempeño y de las reevaluaciones  
de los proveedores externos.

**6.6.3.** El laboratorio debe comunicar a los  
proveedores externos sus requisitos para:

- a. los productos y servicios que se van a  
suministrar;
- b. los criterios de aceptación;
- c. la competencia, incluyendo cualquier  
calificación requerida del personal;
- d. las actividades que el laboratorio o sus  
clientes pretendan llevar a cabo en las  
instalaciones del proveedor externo.”

Además, indica que cuando un laboratorio utiliza proveedores externos para la emisión de sus resultados, debe informar al cliente sobre las actividades de laboratorio específicas que serán realizadas por proveedores externos y obtener su aprobación previa.

---

## **RECOMENDACIONES DEL EDITOR:**

**Utilizar siempre laboratorios acreditados** bajo la norma ISO/IEC 17025, ya sea para control interno como para muestras oficiales. Permitirá tener respaldo sobre los análisis realizados para presentar en auditorias, visitas oficiales, visitas de clientes y responder ante eventuales reclamos, entre otros.

**Verificar las acreditaciones** mediante solicitud al laboratorio externo de los certificados de acreditación. En caso de haber acreditado con el OAA, se puede acceder a los certificados de acreditación en la web del OAA (<https://oaa.org.ar/entidades-acreditadas/>), búsqueda por esquema (seleccionar laboratorios de ensayo) y en el buscador colocar el nombre del laboratorio que deseen.

**El laboratorio debe tener alcance para los métodos requeridos.** Por ejemplo, el laboratorio está acreditado bajo ISO/IEC 17025 para residuos, pero no tiene alcance en métodos microbiológicos. En este caso enviar muestras para residuos y evitar el envío de muestras para análisis microbiológicos.

**Muestras oficiales:** utilizar laboratorios RedLab acreditados, preferentemente con alcance para las metodologías requeridas. Por ejemplo, para un análisis oficial de un lote de cortes cárnicos con destino USA sería ideal identificar un laboratorio autorizado por el Senasa para la detección y aislamiento de STEC TOP SEVEN (acreditado bajo ISO/IEC 17025) con alcance para MLG 5C. En el caso de que los laboratorios RedLab no tengan autorizados los rubros requeridos se recomienda enviar las muestras a laboratorios acreditados.

**En el anexo 1** podrán encontrar la lista de laboratorios autorizados por el Senasa para análisis de productos y subproductos cárnicos, agua, residuos veterinarios, físico-químicos y microbiológicos. En el mismo anexo podrán verificar los laboratorios acreditados y los alcances metodológicos al 31/10/2023.

ANEXO 1

ANEXO 1

## **ANEXO 1**

## ANEXO 1

RAZÓN SOCIAL	PROVINCIA	RUBRO AUTORIZADO POR EL SENASA PARA PRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS CÁRNICOS/AGUA	ALCANCE ACREDITADO PARA PRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS CÁRNICOS/AGUA	ACREDITADO	INSTITUCIÓN
LABORATORIO BIOQUIMICO MAR DEL PLATA S. A. - FARES TAIE	BUENOS AIRES	RESIDUOS DE MERCURIO (HG) RESIDUOS DE ARSÉNICO (AS) RESIDUOS DE PLOMO (PB) RESIDUOS DE CADMIO (CD)			
LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD MELA-CROM S.C.	BUENOS AIRES	RESIDUOS DE CADMIO (CD) RESIDUOS DE ARSÉNICO (AS) RESIDUOS DE MERCURIO (HG) RESIDUOS DE PLOMO (PB)	ANALISIS FISICO-QUIMICO DEL AGUA (arsénico, glifosato, pH, dureza, nitratos)	SI	OAA
LABORATORIO DE LOS MARES S.A. - LISTER-	BUENOS AIRES	INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. INVESTIGACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NO O157:H7 RECUENTO <i>Staphylococcus aureus</i> RECUENTO DE AEROBIOS MESÓFILOS RECUENTO DE COLIFORMES RECUENTO DE ENTEROBACTERIAS RECUENTO DE <i>Escherichia coli</i>	INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> (ISO 11290-1:2017) INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. (ISO 6579-1:2017Adm.1:2020)	SI SI	OAA OAA
LABORATORIO FDC FOOD DRUGS & COSMETICS S.R.L.	BUENOS AIRES	INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. RECUENTO DE <i>Escherichia coli</i> INVESTIGACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NO O157:H7 RECUENTO DE ENTEROBACTERIAS			
LABORATORIO LABER (DOMVIL S.A.)	ENTRE RIOS	DETECCIÓN DE <i>Salmonella</i> spp.			
LABORATORIO LITORAL SA	SANTA FE	RESIDUOS DE QUINOLONAS RESIDUOS DE FENICOLES G2 RESIDUOS DE METABOLITOS DE NITROFURANOS RESIDUOS DE CADMIO (CD) RESIDUOS DE PLOMO (PB) RESIDUOS DE AMINOGLUCOSÍDOS RESIDUOS DE ARSÉNICO (AS) RESIDUOS DE BENCIMIDAZOLES G3 RESIDUOS DE CARBAMATOS RESIDUOS DE COCCIDIOSTÁTICOS G1 RESIDUOS DE DICLAZURIL RESIDUOS DE ENDECTOCIDAS RESIDUOS DE MACRÓLIDOS G1 RESIDUOS DE SULFONAMIDAS G2 RESIDUOS DE TETRACICLINAS G2 RESIDUOS DE TIROSTÁTICOS RESIDUOS DE BETA AGONISTAS G3 RESIDUOS DE CEFTIOFUR RESIDUOS DE CLOPIDOL RESIDUOS DE CORTICOIDES G2 RESIDUOS DE QUINOXALINAS RESIDUOS DE COLISTINA RESIDUOS DE PLAGUICIDAS ORGANOFSFORADOS RESIDUOS DE PIRETROIDES RESIDUOS DE PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS Y POLICLOROBIFENILOS RESIDUOS DE FIPRONIL RESIDUOS DE TETRACICLINAS G3 (BC) RESIDUOS DE TOLTRAZURIL RESIDUOS DE MADURAMICINA RESIDUOS DE MERCURIO (HG) RESIDUOS DE NICARBACINA RESIDUOS DE TRANQUILIZANTES RESIDUOS DE ANDRÓGENOS G1 RESIDUOS DE AINES G1 (ANTINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES G1)	RESIDUOS DE QUINOLONAS RESIDUOS DE FENICOLES G2 RESIDUOS DE METABOLITOS DE NITROFURANOS RESIDUOS DE CADMIO (CD)	SI SI SI SI	OAA OAA OAA OAA

## ANEXO 1

RAZÓN SOCIAL	PROVINCIA	RUBRO AUTORIZADO POR EL SENASA PARA PRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS CÁRNICOS/AGUA	ALCANCE ACREDITADO PARA PRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS CÁRNICOS/AGUA	ACREDITADO	INSTITUCIÓN
		RESIDUOS DE BETALACTÁMICOS Y CEFALOSPORINAS G1 RESIDUOS DE ESTRÓGENOS RESIDUOS DE SEMDURAMICINA RESIDUOS DE NITROIMIDAZOLES INVESTIGACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS POR TÉCNICAS TRADICIONALES INVESTIGACIÓN DE MICROORGANISMOS NO PATÓGENOS INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. INVESTIGACIÓN DE STEC INVESTIGACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NO O157:H7 INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> RECUENTO DE AEROBIOS MESÓFILOS RECUENTO DE COLIFORMES RECUENTO DE <i>Escherichia coli</i>			
LAIA S.A.	CABA	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUA	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUA (mesófilos)	SI	OAA
LAQEI - LABORATORIO DE ANALISIS QUIMICOS E INDUSTRIALES	BUENOS AIRES	INVESTIGACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NO O157:H7 INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp.	INVESTIGACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NO O157:H7 INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. (ISO 6579:2017, ISO 6579:2017 Amd. 1:2020) ANALISIS FISICO-QUIMICO DEL AGUA (cromo, sulfato, cloruro)	SI SI	OAA OAA
NAVECO	BUENOS AIRES	INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> INVESTIGACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NO O157:H7 RECUENTO DE <i>Escherichia coli</i>  ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO CARNES	INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. (ISO 6579-1:2017 Amd. 1:2020, USDA MLG 4) INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> (USDA MLG 8)  ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO CARNES (cenizas, proteínas, grasa libre) AGUA PARA CONSUMO-MICROBIOLOGICO (ISO 9308-1:2014 / AMD1:2016)	SI SI  SI SI	OAA OAA  OAA OAA
QUIMICA MATCO	BUENOS AIRES	INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. INVESTIGACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NO O157:H7 INVESTIGACIÓN DE STEC RECUENTO DE <i>Escherichia coli</i>	INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> (USDA-MLG 8.10 2017) INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. (ISO 6579-1:2017/ AMD1:2020)  ANALISIS FISICO-QUIMICO DEL AGUA (dureza, amonio, cloruros, nitratos)	SI SI	OAA OAA
RAFELAB	SANTA FE	INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. INVESTIGACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NO O157:H7 RECUENTO DE <i>Escherichia coli</i> RECUENTO DE AEROBIOS MESÓFILOS RECUENTO DE <i>Bacillus cereus</i> RECUENTO DE COLIFORMES			
RONCAROLI JULIO E. Y MARIA C. FARINATI	BUENOS AIRES	INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. INVESTIGACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NO O157:H7	INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. (USDA-FSIS MLG 4.9)	SI	OAA

## ANEXO 1

RAZÓN SOCIAL	PROVINCIA	RUBRO AUTORIZADO POR EL SENASA PARA PRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS CÁRNICOS/AGUA	ALCANCE ACREDITADO PARA PRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS CÁRNICOS/AGUA	ACREDITADO	INSTITUCION
SABBAG NORA GUADALUPE (LABORATORIO DE ANALISIS INDUSTRIALES)	SANTA FE	INVESTIGACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NO O157:H7 INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. RECUENTO DE <i>Escherichia coli</i> ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO CARNES	ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO CARNES (humedad, nitrogeno, grasas, cenizas) ANALISIS FISICO-QUIMICO DEL AGUA (nítitos, dureza, sólidos) microbiología de agua (aerobios totales, <i>P. aeruginosa</i> , coliformes, <i>E. coli</i> )	SI SI SI	OAA OAA OAA
S.G.S ARGENTINA S.A.	CABA	INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> INVESTIGACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NO O157:H7 INVESTIGACIÓN DE STEC INVESTIGACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS POR TÉCNICAS TRADICIONALES INVESTIGACIÓN DE MICROORGANISMOS NO PATÓGENOS RECUENTO DE AEROBIOS MESÓFILOS RECUENTO DE COLIFORMES RECUENTO DE ENTEROBACTERIAS RECUENTO DE <i>Escherichia coli</i> RECUENTO <i>Staphylococcus aureus</i> RESIDUOS DE TIROSTÁTICOS RESIDUOS DE CARBAMATOS RESIDUOS DE TETRACICLINAS G2 RESIDUOS DE METABOLITOS DE NITROFURANOS RESIDUOS DE TRANQUILIZANTES RESIDUOS DE MACRÓLIDOS G1 RESIDUOS DE QUINOLONAS RESIDUOS DE ARSEÑICO (AS) RESIDUOS DE MERCURIO (HG) RESIDUOS DE SEMDURAMICINA RESIDUOS DE CADMIO (CD) RESIDUOS DE PLOMO (PB)	INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. (ISO 6579-1:2017/AMD1:2020) INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> (ISO 11290-1:2017)  RECUENTO DE <i>Escherichia coli</i> (ISO 16649-2:2001, ISO 16649-3:2015)	SI SI	OAA OAA
			ANALISIS DE AGUA (cloruros, sulfatos, conductividad, pH, nitratos, mercurio, cianuro, metales, fluoruro, nitrito)	SI	OAA
STAMBOULIAN SERVICIOS DE SALUD	CABA	INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. INVESTIGACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NO O157:H7 INVESTIGACIÓN DE STEC	INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. (ISO 6579-1:2017/Amd.1:2020) INVESTIGACIÓN DE STEC (ISO 13136:2012)  INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> (ISO 11290-1:2017) INVESTIGACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (ISO 16654:2001/AMD2:2023, Norma MFLP-76-Abril 2020)	SI SI	OAA OAA
VERILAB	CABA	RECUENTO DE <i>Escherichia coli</i> INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> INVESTIGACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NO O157:H7 INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp.	INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> (USDA-FSIS/MLG 8.10) INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. (ISO 6579:1-2017/AMD 1:2020, USDA/FSIS MLG 4.12)	SI SI	OAA OAA
VERILAB SA	ENTRE RIOS	DETECCIÓN DE <i>Salmonella</i> spp.	DETECCION DE <i>Salmonella</i> (ISO 6579:1-2017/ AMD 1:2020, USDA/FSIS MLG 4.12)	SI	OAA
XENOBIOTICOS SRL	CABA	RESIDUOS DE METABOLITOS DE NITROFURANOS RESIDUOS DE CADMIO (CD) RESIDUOS DE PLOMO (PB) RESIDUOS DE PLAGUICIDAS ORGANOEFOSFORADOS RESIDUOS DE MADURAMICINA RESIDUOS DE MERCURIO (HG) RESIDUOS DE AMINOGLUCOSÍDOS RESIDUOS DE NICARBACINA RESIDUOS DE ANDRÓGENOS G1 RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS G1	RESIDUOS DE METABOLITOS DE NITROFURANOS RESIDUOS DE CADMIO (CD) RESIDUOS DE PLOMO (PB) RESIDUOS DE PLAGUICIDAS ORGANOEFOSFORADOS	SI SI SI SI	OAA OAA OAA OAA

## ANEXO 1

RAZÓN SOCIAL	PROVINCIA	RUBRO AUTORIZADO POR EL SENASA PARA PRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS CÁRNICOS/AGUA	ALCANCE ACREDITADO PARA PRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS CÁRNICOS/AGUA	ACREDITADO	INSTITUCIÓN
		RESIDUOS DE AINES G1 (ANTINFLAMATORIOS NO ESTERIODES G1) RESIDUOS DE BETALACTÁMICOS Y CEFALOSPORINAS G1 RESIDUOS DE ESTROGENOS RESIDUOS DE FENICOLES G2 RESIDUOS DE NITROIMIDAZOLES RESIDUOS DE SEMDURAMICINA RESIDUOS DE QUINOXALINAS RESIDUOS DE TETRACICLINAS G2 RESIDUOS DE TETRACICLINAS G3 (BC) RESIDUOS DE ARSÉNICO (AS) RESIDUOS DE BENCIMIDAZOLES G3 RESIDUOS DE COCCIDIOSTÁTICOS G1 RESIDUOS DE DICLAZURIL RESIDUOS DE QUINOLONAS RESIDUOS DE SULFONAMIDAS G2 RESIDUOS DE CARBAMATOS RESIDUOS DE TIROSTÁTICOS RESIDUOS DE TRANQUILIZANTES RESIDUOS DE BETA AGONISTAS G3 RESIDUOS DE CEFTIOFUR RESIDUOS DE CORTICOIDES G2 RESIDUOS DE CLOPIDOL RESIDUOS DE COLISTINA RESIDUOS DE FIPRONIL RESIDUOS DE PIRETROIDES RESIDUOS DE PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS Y POLÍCLOROBIFENILOS RESIDUOS DE ENDECTOCIDAS RESIDUOS DE MACRÓLIDOS G1 RESIDUOS DE TOLTRAZURIL			
ZORMEX S.A.	CABA	INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> RECUENTO DE <i>Escherichia coli</i> INVESTIGACIÓN DE <i>Escherichia coli</i> NO O157:H7	INVESTIGACIÓN DE <i>Salmonella</i> spp. (a ISO 6579-1:2017/AMD 1:2020) INVESTIGACIÓN DE <i>Listeria monocytogenes</i> (USDA/FSIS MLG8.10)	SI SI	OAA OAA



# **CAPÍTULO III**

## **LABORATORIO DE PLANTA FRIGORÍFICA**

*Magdalena Costa*

Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP,  
IGEVET Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N. Dulout"  
(UNLP-CONICET LA PLATA), La Plata, Argentina

En el Reglamento de Inspección de Productos, Subproductos y Derivados de Origen Animal (Decreto 4238/68), Capítulo VII, LABORATORIOS, apartado 7.2 se lee “Los establecimientos con Inspección Veterinaria Nacional deberán contar con un laboratorio capacitado para efectuar los exámenes químicos, físicos y bacteriológicos que se exigen en este Reglamento y los que el Senasa juzgue necesarios para garantizar la sanidad de los productos”.

La implementación de un laboratorio en un frigorífico está condicionada por las necesidades de cada planta y los análisis que se pretenden realizar. En este contexto, se deben considerar los siguientes componentes:

- A. Instalaciones.
- B. Bioseguridad.
- C. Personal.
- D. Limpieza y desinfección.
- E. Tratamiento de residuos.

## A. INSTALACIONES

En el capítulo VII del Reglamento de Inspección de Productos, Subproductos y Derivados de Origen se establecen pautas para los laboratorios. Si bien este capítulo es del año 1983, marca un importante precedente al momento de instalar un laboratorio en un frigorífico, en especial los siguientes apartados:

Apartado 7.2.8. El laboratorio debe estar bien ubicado con referencia a los vientos y al sol, alejado de los corrales y playa de faena, y aislado de trepidaciones. Será construido totalmente de mampostería revocada con friso impermeable, estará dotado de agua corriente, red cloacal o equivalente, luz eléctrica y gas suficiente. El piso será totalmente de mosaicos u otro material impermeable y las paredes impermeabilizadas en su totalidad.

Apartado 7.2.11. El laboratorio dispondrá de un depósito para materiales y drogas, un depósito para útiles de limpieza, un cuarto de vestir con armarios e instalaciones sanitarias completas, con inodoro, lavabo y ducha con agua caliente y fría, una cocina de laboratorio con autoclave, horno, heladera y mesada de mármol u otro material similar.

Actualmente, los laboratorios de planta frigorífica deben contar con áreas generales y áreas destinadas a muestras y análisis, las cuales estarán separadas o muy bien delimitadas de acuerdo con los objetivos del laboratorio.

### Áreas destinadas a muestras y análisis:

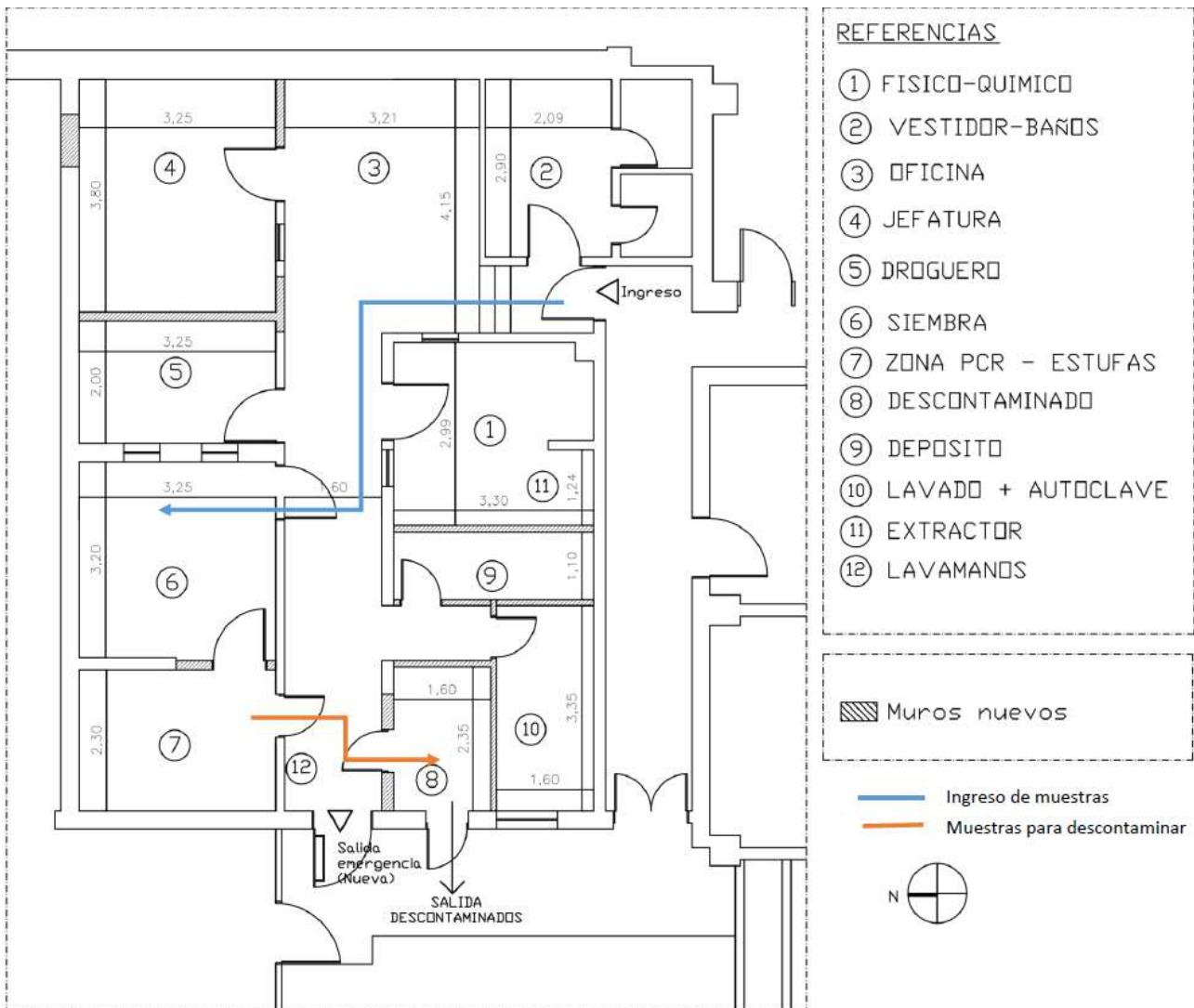
- Recepción y almacenamiento de las muestras (heladeras y freezers).
- Preparación, procesamiento y análisis de las muestras.
- Incubación (estufas de cultivo).
- Manipulación de muestras potencialmente contaminadas con patógenos (cabina de seguridad biológica).
- PCR.
- Preparación y esterilización de material (medios de cultivo, material para muestra).
- Descontaminación (autoclave).
- Droguero para almacenamiento de reactivos y medios de cultivo.

### Áreas generales:

- Entradas, pasillos, escaleras, ascensores.
- Oficinas (secretaría, salas de documentación).
- Vestuario y baños.
- Archivos.
- Droguero y depósito. Los productos químicos peligrosos deben ser almacenados en edificios, habitaciones, armarios o cabinas especialmente diseñados para tal fin.

## Consideraciones para el diseño de un laboratorio de planta frigorífica:

- ✓ Las paredes, techos y suelos deben ser lisos, fáciles de limpiar, y resistentes a los detergentes y a los desinfectantes utilizados.
- ✓ Los pisos deben ser antideslizantes y tener zócalos sanitarios.
- ✓ Las ventanas deben estar selladas. Se pueden utilizar contraventanas o paneles de vidrio tratados para evitar la radiación solar. No es adecuado el uso de persianas instaladas en el interior ya que pueden dificultar la limpieza y convertirse en una fuente de contaminación.
- ✓ En caso de utilizar tuberías elevadas para transportar líquidos, estas no deben cruzar las salas a no ser que estén aisladas herméticamente. Las demás estructuras elevadas deben estar recubiertas o ser de fácil acceso para su limpieza.
- ✓ Disponer de espacio suficiente que facilite el orden y la limpieza en las áreas de trabajo. El espacio requerido debe ser proporcional al volumen de análisis realizados y a la organización general interna del laboratorio.
- ✓ Mórbiliario de material liso e impermeable fácil de limpiar y desinfectar (por ejemplo, mobiliario móvil).
- ✓ Disponer de lavamanos en las áreas de análisis.
- ✓ Disponer de alcohol en gel en las áreas generales y especialmente cerca de la puerta de entrada.
- ✓ Disponer de un autoclave para el tratamiento de material contaminado (muestras, medios de cultivo, etc.).
- ✓ Disponer de sistemas de seguridad que incluyan protección contra el fuego, emergencias eléctricas, ducha de emergencia, lavaojos y servicios de primeros auxilios.
- ✓ Disponer de suministro de electricidad seguro y de suficiente capacidad, así como de un sistema de iluminación de emergencia que permita salir del laboratorio en condiciones de seguridad. Conviene contar con un grupo eléctrico para alimentar el equipo esencial.
- ✓ Evitar condiciones extremas: exceso de temperatura, polvo, humedad, vapor, ruido, vibraciones, etc. La temperatura ambiente debe estar entre 18°C y 27°C.
- ✓ **Evitar el riesgo de contaminación cruzada.** Diseñar el laboratorio bajo el principio de distribución de “no retorno” o “en un solo sentido”. Se asume que el ingreso de muestras es el lugar menos contaminado y la sala de descontaminación es el lugar más contaminado. El flujo de la muestra siempre debe ser del área menos contaminada a la más contaminada sin regresar a áreas intermedias. En la figura 1 se presenta el plano de un laboratorio de planta frigorífica con las áreas debidamente identificadas y separadas. Se puede observar el flujo de ingreso (color azul) y análisis de las muestras microbiológicas, como así también el flujo del material contaminado (color rojo) y su descarte final del laboratorio.



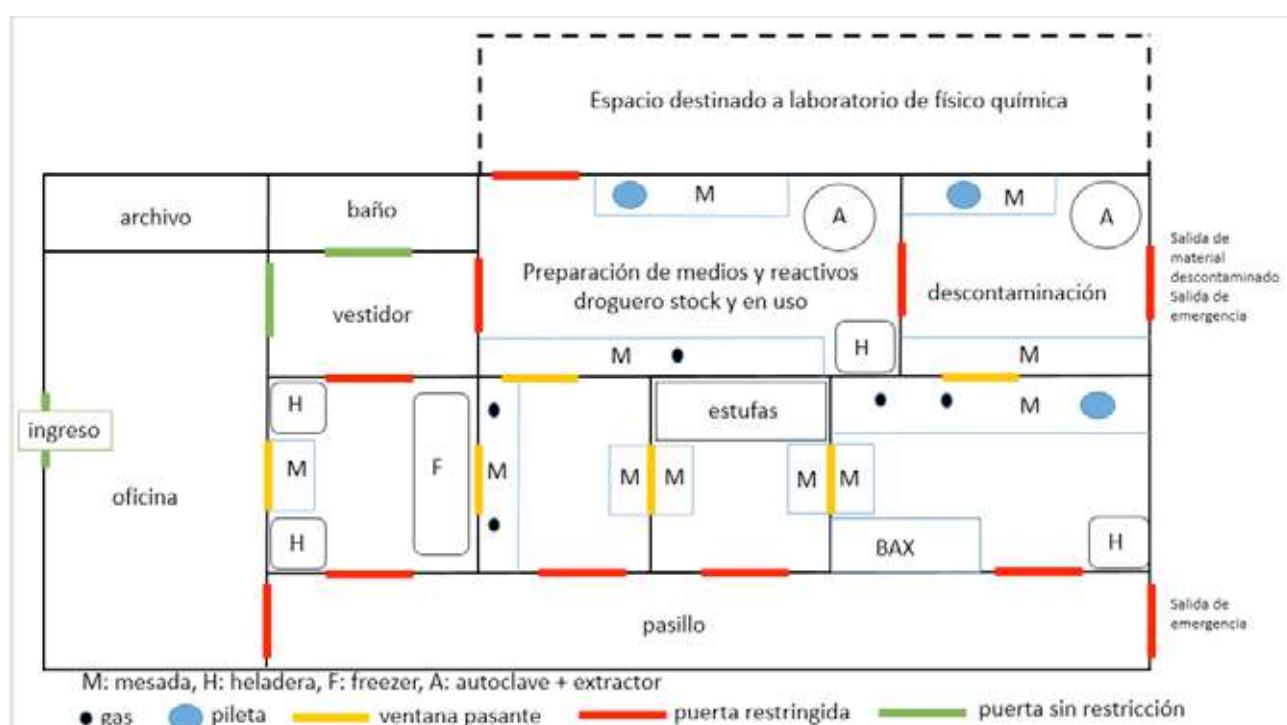
**Figura 1.** Plano de un laboratorio de planta frigorífica.

Se recomienda dibujar el plano del laboratorio a construir o bien del laboratorio en funcionamiento para analizar el flujo de la muestra, desde que ingresa hasta que se elimina del laboratorio.

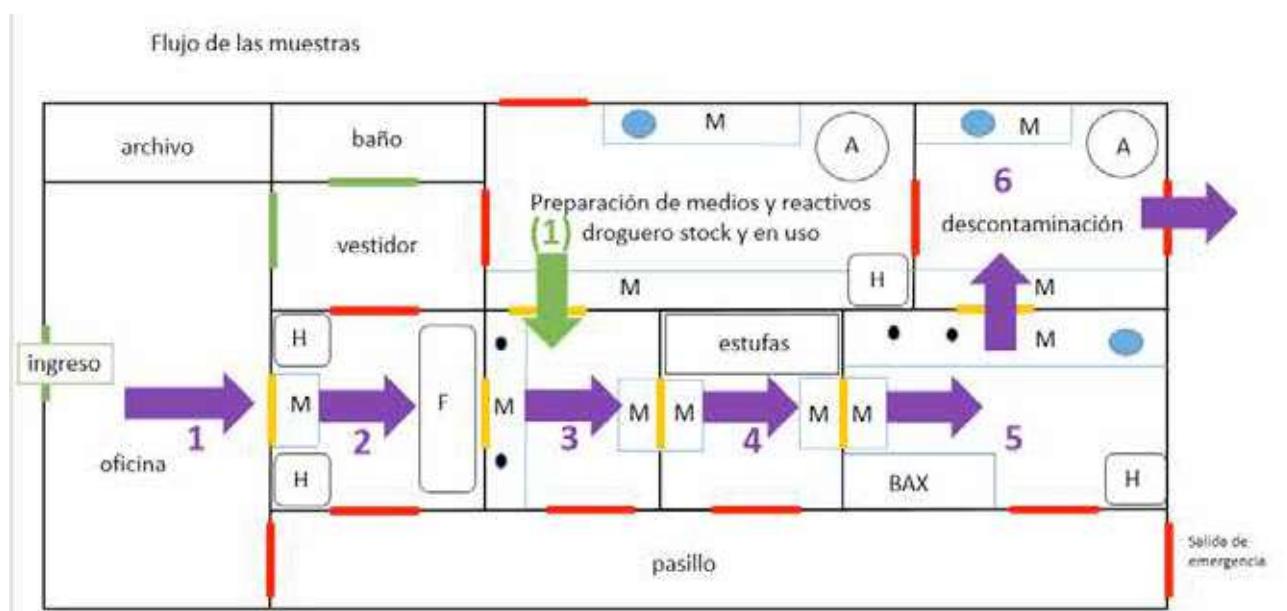
En la figura 2 se presenta el diseño de un laboratorio microbiológico de planta, en el cual se identifican las áreas generales y analíticas. Además se identifican puertas, ventanas pasantes, piletas, mesadas, puntos de acceso a gas y ubicación de equipamiento (heladeras, freezers, termociclador,

autoclave). Inclusive se identifica un área no construida donde se prevé la instalación del laboratorio de análisis físico-químicos.

En la figura 3 se presenta el flujo de las muestras agregado al diseño del laboratorio. Este ejercicio permite optimizar el trabajo y minimizar riesgos.



**Figura 2.** Plano de un laboratorio de planta frigorífica sin identificación del flujo de las muestras.



1: recepción de la muestra y registro. 2: acondicionamiento y acopio en frío. 3: pesada y procesamiento primario.  
4: incubación. 5: procesamiento de muestras incubadas (BAX, recuento). 6: descontaminación y salida  
(1): incorporación de los medios de cultivo y reactivos estériles

**Figura 3.** Plano de un laboratorio de planta frigorífica con identificación del flujo de las muestras.

## B. BIOSEGURIDAD.

La bioseguridad es un concepto amplio que implica una serie de medidas orientadas a proteger al personal que trabaja en el laboratorio, a la muestra y al medio ambiente.

El laboratorio constituye un medio ambiente de trabajo especial con potenciales riesgos y es por ello necesario cumplir con requisitos de bioseguridad. A continuación se enumeran algunas recomendaciones:

- Diseñar las instalaciones para garantizar un trabajo seguro y con la calidad requerida.
- Implementar procedimientos estándares, generales y particulares.
- Disponer de equipos de bioseguridad (Ver capítulo IV de este manual).
- Todo el personal del laboratorio debe conocer y poner en práctica las normativas de bioseguridad, deben conocer los riesgos de los procedimientos específicos que llevan a cabo rutinariamente. Tanto el personal activo del laboratorio como el personal nuevo deberá recibir una inducción (capacitación) inicial en bioseguridad y si es posible firmar constancia de compromiso relacionada con la bioseguridad del laboratorio.

### Principios de Bioseguridad

a. **Universalidad:** las medidas de bioseguridad deben involucrar a todos los departamentos del laboratorio. El personal y los visitantes deben cumplir con los protocolos establecidos para prevenir accidentes. Todos los laboratorios deben tener un responsable de bioseguridad. El responsable de bioseguridad debe garantizar el cumplimiento de los protocolos y la dirección del laboratorio debe instrumentar los medios para que se cumplan.

b. **Uso de barreras:** para evitar la exposición directa a todo tipo de muestras orgánicas potencialmente contaminantes mediante la utilización de materiales o

barreras adecuadas que se interpongan al contacto con las mismas, reduciendo los accidentes.

- c. **Medios de eliminación del material contaminado:** es el conjunto de dispositivos y procedimientos para procesar los materiales utilizados en la toma de muestras, en los análisis y en la eliminación de las muestras biológicas.
- d. **Evaluación de riesgos:** análisis de la probabilidad que ocurran daños, heridas o infecciones en el laboratorio. La evaluación de los riesgos debe ser efectuada por el personal de laboratorio familiarizado con el procesamiento de los agentes de riesgo, el uso del equipamiento e insumos y la contención correspondiente. Una vez establecido, el nivel de riesgo debe ser reevaluado y revisado de forma permanente. La evaluación está sistemáticamente asociada con el manejo de los riesgos en el laboratorio con el objeto de formular un plan de mitigación.

### En el laboratorio los accidentes están relacionados con:

- El carácter potencialmente peligroso (tóxico o infeccioso) de la muestra.
- Uso inadecuado de equipos de protección.
- Errores humanos. Malos hábitos del personal.
- Incumplimiento de las normas.

### Los accidentes pueden ser causados por:

- Agentes físicos y mecánicos: quemaduras por exposición a muy altas/bajas temperaturas, cortaduras por vidrios o recipientes rotos, malas instalaciones que generan posturas inadecuadas, caídas por pisos resbalosos, incendios, inundaciones, instalaciones eléctricas inadecuadas, etc.
- Agentes químicos: exposición a productos corrosivos, tóxicos, irritantes, sensibilizantes o cancerígenos por in-

halación, contacto con piel o mucosas, por heridas o ingestión. Exposición a agentes inflamables o explosivos.

- Agentes biológicos: contacto directo o indirecto con microorganismos patógenos. El riesgo depende de la naturaleza del agente (exótico o autóctono), su patogenicidad, virulencia, modo de transmisión y la vía de transmisión (inhalación de aerosoles, inoculación con agentes punzantes, contacto), concentración en el inóculo, dosis infectiva, estabilidad en el ambiente y la existencia de una profilaxis eficiente o la posibilidad de una intervención terapéutica.

e. **Gestión de la evaluación de riesgos:** el proceso para implementar un plan de gestión de riesgos en el laboratorio se puede dividir en cuatro pasos:

- Diseño de un mapa de procesos: para obtener una imagen global de los procesos de un laboratorio.
- Identificación y evaluación de riesgos: para valorar cada riesgo se consideran tres variables: gravedad (g), frecuencia (f) y detección (d). El producto de las tres variables ( $g \cdot f \cdot d$ ) permite obtener el número de prioridad de riesgo (NPR), que permite identificar los riesgos más críticos.
- Identificación de oportunidades de mejora: se define un plan de actuación que permita establecer oportunidades de mejora y hacer un seguimiento a lo largo del tiempo para actuar ante los riesgos prioritarios.
- Monitoreo de acciones y reevaluación de riesgos: se establece el seguimiento de las acciones y se evalúa de forma periódica. Cuando las acciones estén evaluadas se calcula el NPR y se monitorean los riesgos que no se hayan mitigado.

### Barreras de bioseguridad en el laboratorio

Toda muestra que ingresa al laboratorio debe ser considerada como material de riesgo. Cuando se manipulan muestras

de alimentos o cultivos microbiológicos, se deben mantener las medidas de bioseguridad para evitar la propagación de microorganismos perjudiciales para la salud y el medio ambiente. En este contexto, la experiencia de los analistas es fundamental y no puede sustituirse por un equipo o instrumento.

Es posible reducir accidentes utilizando barreras para evitar la exposición directa a todo tipo de muestra potencialmente contaminante:

• **Barreras primarias:** la cabina de seguridad biológica (BSC) (Ver capítulo IV de este manual) es el principal equipo utilizado para contener salpicaduras o aerosoles infecciosos generados por diversos procedimientos microbiológicos. Entre las barreras primarias también se incluyen elementos de protección personal, tales como guantes, ambos, guardapolvos, cobertores de zapatos, botas, máscaras faciales, anteojos de seguridad o antiparras. Los equipos de protección personal se utilizan en combinación con la BSC.

• **Barreras secundarias:** el diseño y la construcción de las instalaciones contribuyen a la protección de quienes trabajan en el laboratorio, proporcionan una barrera para proteger a las personas que se encuentran fuera del laboratorio, y protegen a la comunidad de agentes infecciosos que pueden ser liberados accidentalmente del laboratorio. Los laboratorios que manipulan muestras biológicas potencialmente infecciosas o trabajan con agentes microbiológicos pueden ser clasificados en cuatro tipos, de acuerdo con los niveles de bioseguridad que deben cumplir sus instalaciones, los equipos y prácticas de bioseguridad empleados y a los fines para los cuales fueron construidos. Cada nivel de bioseguridad es específicamente apropiado para las operaciones llevadas a cabo, las vías de transmisión documentadas o sospechadas de los agentes infecciosos,

la función o la actividad del laboratorio y los microorganismos con los que se trabaja.

**NOTA:** en los laboratorios de plantas frigoríficas se trabaja habitualmente con niveles de bioseguridad 1 y 2.

**Tabla 3.** Clasificación de los niveles de bioseguridad de los laboratorios, según microorganismo, prácticas, barreras primarias y secundarias.

BSL	MICROORGANISMOS	RIESGO	PRÁCTICAS	EQUIPOS DE SEGURIDAD (BARRERAS PRIMARIAS)	INSTALACIONES (BARRERAS SECUNDARIAS)
1	Con baja probabilidad de causar enfermedad en el hombre y los animales.	- Nulo o muy bajo para el individuo y para la comunidad.	Prácticas microbiológicas estándares.	Ninguna.	Mesada de trabajo abierta con pileta en el laboratorio.
2	Pueden causar enfermedad en el hombre y los animales. Baja probabilidad de amenaza grave para los trabajadores del laboratorio, la comunidad o el medio ambiente. Potencial transmisión percutánea o por ingestión.	- Moderado para el individuo y bajo para la comunidad. - Existen medidas preventivas y tratamientos eficaces.	- Cumplir con las prácticas de BSL-1. - Acceso restringido. - Cartelería de riesgo biológico. - Precauciones de objetos punzantes. - Descontaminación de los desechos. - Políticas de control médico.	- BSC Clase I o II. - Dispositivos de contención física para la manipulación de muestras. - Guardapolvo. - Guantes. - Protección del rostro.	- BSL-1. - Autoclave.
3	Pueden causar enfermedades graves en el hombre y los animales. Baja probabilidad de propagarse de un individuo a otro. Potencial transmisión por aerosol.	- Alto para el individuo y bajo para la comunidad. - Existen medidas preventivas y tratamientos eficaces.	- Cumplir con las prácticas de BSL-2. - Acceso controlado - Descontaminación de la ropa de laboratorio antes del lavado.	- BSC Clase II - Protección respiratoria	- BSL-2. - Separación física de los corredores de acceso. - Acceso de cierre automático con doble puerta. - No se recircula el aire de escape. - Flujo de aire negativo en el laboratorio.
4	Pueden causar enfermedades graves en el hombre y los animales. Alta probabilidad de propagarse de un individuo a otro por una vía directa o indirecta.	- Alto para el individuo y para la comunidad. - No existen medidas preventivas ni tratamientos eficaces.	- Cumplir con las prácticas de BSL-3. - Cambio de ropa antes de ingresar. - Ducha al salir. - Descontaminación de todos los materiales a la salida de las instalaciones	Los procedimientos deben ser realizados en BSC Clase III junto con personal y uniforme de cuerpo entero, con aire y presión positiva.	BSL-3 más: - Edificio separado o zona aislada. - Sistema de vacío y descontaminación exclusivos.

## Cartelería

El laboratorio debe establecer la cartelería a utilizar de acuerdo con sus necesidades y los procedimientos de seguridad y bioseguridad establecidos. Los accesos a

las diferentes dependencias del laboratorio deben contar con señalética adecuada. Las señales de uso habitual corresponden a las siguientes (se muestran algunos ejemplos):

INDICACIÓN	CARTELERÍA
Riesgo biológico	 <b>RIESGO BIOLOGICO</b>
Uso de delantal/bata/guardapolvo	 <b>USO OBLIGATORIO DE GUARDAPOLVO</b>
Uso de mascarilla	 <b>USO DE MASCARILLA OBLIGATORIO</b>
Uso de calzado de seguridad	 <b>USO OBLIGATORIO DE CALZADO DE SEGURIDAD</b>
Temperatura extrema calor/quemaduras	 <b>PELIGRO ALTA TEMPERATURA</b>
Temperatura extrema/congelación	 <b>EXPOSICIÓN A LAS TEMPERATURAS</b>
Uso de guantes	 <b>USO OBLIGATORIO DE GUANTES</b>

## C. PERSONAL

En el Capítulo VII del Decreto 4238/68 se establece que el laboratorio contará con personal técnico y auxiliar necesario para practicar regularmente los exámenes a que se refiere el apartado 7.2 del Reglamento.

En el apartado 7.2.6 se define que los laboratorios deben tener un Técnico Responsable con título universitario habilitante nacional de profesional veterinario, bioquímico o químico.

### Consideraciones para el personal de un laboratorio de planta frigorífica:

- Siempre debe utilizar guardapolvo cerrado y de manga larga, limpio y en buenas condiciones. El guardapolvo debe ser de uso exclusivo para el laboratorio y se debe colgar en un perchero a la entrada del laboratorio. No se debe guardar en casilleros personales ni llevar al hogar.
- El guardapolvo se debe cambiar al menos una vez por semana. Los guardapolvos deben ser sometidos a descontaminación en el laboratorio.
- El personal de laboratorio no debe circular con el guardapolvo en las áreas en que se consumen alimentos ni fuera del laboratorio.
- Los analistas deben utilizar calzado cerrado con el fin de evitar la exposición de los pies a agentes biológicos, físicos o que puedan causar lesiones.
- El uso de guantes, barbijo, mascarillas, lentes y vestimenta especial de protección se debe utilizar dependiendo de la seguridad requerida en los procedimientos específicos.
- En las áreas de laboratorio no es permitido ingresar con alimentos, excepto aquellos que son muestras para análisis de laboratorio, las cuales ingresan como muestras y se almacenan en un lugar definido.
- Se prohíbe fumar, comer, beber, colocarse lentes de contacto y aplicarse cosméticos en el laboratorio.
- No se debe pipetear ningún tipo de sustancia con la boca.
- Los analistas con cabello largo deben recogerlo o cubrirlo con una cofia desechable.
- Se debe utilizar guantes para todos los trabajos que obliguen el contacto con material potencialmente contaminado. Antes de colocarse los guantes se debe quitar los anillos. Los guantes usados se descartan en bolsa roja (residuos patológicos).
- El personal debe mantener las uñas limpias y cortas, y se debe lavar las manos antes y después de manipular material biológico, después de quitarse los guantes, antes de abandonar el área de trabajo y al finalizar la jornada laboral.
- Para el lavado de manos se debe utilizar jabón líquido y antiséptico procedente de un dispensador mantenido en buenas condiciones de limpieza.
- Para el secado de las manos se debe utilizar papel de un solo uso o toallas de un solo uso. Estas precauciones son aplicables tanto al personal del laboratorio como a los visitantes.
- Los analistas deben mantener las manos alejadas de la boca, ojos, nariz y cara. Asimismo, mantener alejado de la boca cualquier material que se encuentre dentro del laboratorio (lapiceras, lápices).
- Cuando el trabajador presente lesiones cutáneas, debe cubrirlas con apósitos impermeables y no debe manipular muestras biológicas.
- Se deben usar lentes de seguridad mientras se manipulen reactivos y sustancias biológicas que pueden producir salpicaduras o aerosoles.
- En los casos de que se utilicen mascarillas de seguridad, estas se deben almacenar en una bolsa plástica con el nombre de usuario y fecha de apertura. Las mascarillas son de uso personal. Una vez transcurrida su vida útil, será descartada en la bolsa roja.
- Cuando se trabaje con medios, cultivos

- y muestras expuestas se debe evitar hablar.
- El uso de auriculares para escuchar música está prohibido en las áreas de análisis.
  - Todo accidente que ocurra en el laboratorio debe ser reportado en forma inmediata a los superiores y registrado en el formulario respectivo.
  - Para eventuales accidentes es necesario contar con un protocolo de contención.

### **Protocolo de contención de emergencias del laboratorio de microbiología**

Lo más importante ante un accidente en el laboratorio es tenerlo previsto, realizar el simulacro de accidente como mínimo una vez al año, discutir las medidas a tomar y sacar las conclusiones pertinentes, y disponer del material necesario para actuar.

Algunos ejemplos de accidentes biológicos y las recomendaciones de acción pueden ser:

#### **✓ Inoculación accidental:**

- Lavar la herida con abundante agua y jabón.
- Acudir a urgencias si es necesario.
- Informar al servicio médico en planta y/o a la ART.

#### **✓ Derrames:**

- Actuar con guantes y guardapolvo.
- Extender un desinfectante (hipoclorito de sodio 1000 ppm) en cantidad suficiente para empapar toda la superficie afectada. Dejar que actúe el desinfectante antes de recoger el material.
- Eliminar los restos groseros de cristal, plástico, agar, etc.
- Lavar con abundante agua y un detergente acuoso.
- Secar.
- Limpiar con alcohol isopropílico retirando todos los restos de desinfectante.

#### **✓ Salpicaduras en cara y ojos:**

- Lavar con abundante agua.
- Concurrir al servicio médico en planta y/o a la ART con la referencia del agente químico o infeccioso.

#### **✓ Salpicaduras y contacto directo:**

- Sobre piel descubierta. Lavar con abundante agua.
- Sobre la ropa. Valorar si se debe y puede cambiar o si se requiere ducha de emergencia.

#### **✓ Salpicaduras en la Cabina de Seguridad Biológica:**

- **Riesgo alto** (derrames de gran volumen y que pasan a la bandeja inferior).
  - No detener la cabina.
  - Actuar con guantes y guardapolvo
  - Extender un desinfectante en cantidad suficiente para empapar toda la superficie de trabajo e inundar la cubeta inferior.
  - Evitar el uso de alcohol ya que, debido al gran volumen que se necesita, puede existir peligro de incendio.
  - Dejar que actúe el desinfectante.
  - Limpiar la cabina.
  - Dejar la cabina prendida por 10 min más
  - Limpiar con alcohol isopropílico retirando todos los restos de desinfectante.

- **Riesgo moderado** (salpicadura que queda limitada a la superficie de trabajo o que fue absorbida por el papel secante).

- Desinfectar la zona de trabajo.
- Neutralizar el derrame (toalla absorbente, papel secante, etc.)
- Limpiar con agua y detergente la zona con el equipo de seguridad.
- Desinfectar la zona de trabajo y dejar actuar durante 20 min.

✓ **Salpicaduras en la mesada de trabajo:**

- Con guantes y guardapolvo, neutralizar el derrame (toalla absorbente, papel secante, etc.)
- Desinfectar la zona de trabajo y dejar actuar durante 20 min. Tener cuidado con la aplicación del alcohol y el uso del mechero.

## D. LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

Para realizar la limpieza y desinfección del laboratorio es necesario definir las actividades, los procedimientos y la frecuencia. Es ideal mantener registro de estas actividades.

### Condiciones de las áreas de trabajo para realizar prácticas operativas seguras.

- Verificar el mantenimiento de las instalaciones y el mobiliario para evitar posibles fuentes de contaminación intralaboratorio.
- Los sistemas de ventilación y sus filtros deben tener un mantenimiento periódico.
- Las puertas y ventanas de las áreas donde se manipulan las muestras biológicas deben permanecer cerradas para mantener la adecuada contención biológica.
- Las puertas del laboratorio deben estar señalizadas con la cartelería correspondiente como acceso restringido y los equipos (incubadoras, baños de agua, etc.) deben estar señalizados con el símbolo internacional de riesgo biológico y peligro térmico.

- Sobre las mesas de trabajo solo debe haber materiales o equipos relacionados con las labores de laboratorio.
- Designar responsables para realizar la tarea de limpieza y desinfección del laboratorio. Capacitar al personal.
- El laboratorio debe permanecer siempre ordenado y limpio. Limpiar y desinfectar diariamente. Establecer procedimientos para áreas generales y áreas de procesamiento y análisis de muestras. Antes y después de las tareas, el personal del laboratorio debe desinfectar la mesa de trabajo (alcohol 70 o cloro al 0,1%) y luego limpiar el área con toalla de papel.
- Las superficies contaminadas o potencialmente contaminadas deben descontaminarse utilizando desinfectantes con actividad bactericida o fungicida reconocida.
- Evaluar la calidad microbiológica de las superficies de trabajo del laboratorio, de las superficies de contacto y del aire. La frecuencia dependerá de los resultados de la última comprobación. Para ello se pueden utilizar placas de contacto que contengan adecuados agentes neutralizantes de los antisépticos (lecitina, tiosulfato sódico). La calidad del aire se puede evaluar exponiendo durante 15 min una placa de Petri abierta con un medio de agar no selectivo (agar PCA) o un agar selectivo adecuado para microorganismos específicos (por ejemplo, hongos filamentosos).

Tabla 4. Propiedades de desinfectantes de uso en laboratorios.

DESINFECTANTES	ACTIVO CONTRA								INACTIVADO POR					TOXICIDAD		
	HONGOS	BACTERIAS		MICROBACTERIAS	ESPORAS	VIRUS LIPÍDICOS	VIRUS NO LIPÍDICOS	PROTEÍNAS	MATERIALES NATURALES	MATERIALES SINTÉTICOS	AGUA DURA	DETERGENTE	PIEL	OJOS	PULMONES	
		GRAM- POSITIVAS	GRAM- NEGATIVAS													
HIPOCLORITOS	+	+++	+++	++	++	+	+	+++	+	+	+	C	+	+	+	
ALCOHOLES	-	+++	+++	+++	-	+	V	+	+	+	+	-		+		
FORMALDEHÍDO	+++	+++	+++	+++	+++ <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
GLUTARALDEHÍDO	+++	+++	+++	+++	+++ <sup>b</sup>	+	+	NA	+	+	+	NA	+++	+++	+++	
IODÓFOROS	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+	+	+	A	+	+	-	

+++ bueno.

++ intermedio.

+ débil.

- nulo.

V depende de los virus.

C catiónico.

A aniónico.

NA no aplicable.

<sup>a</sup> Por encima de 40°C.

<sup>b</sup> Por encima de 20°C.

**NOTA:** Pueden utilizarse otros métodos para estimar el nivel de contaminación de las superficies y del aire (Norma ISO 18593).

### Limpieza de material en el laboratorio

**Lavado y enjuague:** cuando el material de vidrio se encuentra contaminado debe ser esterilizado y luego lavado. Para el lavado se puede utilizar una solución de detergente al 2% en agua caliente o seguir las instrucciones del producto utilizado. Sumergir el material en la solución de detergente y dejar reposar. Limpiar con escobilla o esponja y detergente. Enjuagar con agua caliente hasta retirar completamente el detergente que pudo quedar en la superficie del material. Finalmente se enjuaga tres veces con agua destilada. Secar el material a temperatura ambiente en las mesadas y estantes destinados para tal fin. Si se detectan restos de suciedad visibles se repite el ciclo de lavado.

**NOTA:** se debe poseer la hoja de seguridad del detergente utilizado ante cualquier emergencia.

Las tapas de tubos de ensayo y los tubos de ensayo se pueden hervir en una solución de detergente al 2% durante 15 min. Enjuagar con agua caliente, y realizar el ciclo de lavado mencionado anteriormente.

Todo material que se encuentra limpio y seco es guardado en el lugar asignado para tal fin. Además, se examinan los materiales lavados en busca de rajaduras o roturas. De haberlas, se descarta el material inmediatamente.

**NOTA:** evitar la utilización de material incorrectamente lavado, ya que los restos de detergente pueden afectar los ensayos analíticos.

Debido a la importancia de utilizar material libre de residuos de detergente y como reaseguro de la operación de lavado cada vez que se utiliza material de vidrio limpio, se lo enjuaga previamente con agua destilada.

### Esterilización de material limpio:

- Esterilización por calor seco. Utilizar el horno de esterilización durante 60 min a 170°C.
- Esterilización por calor húmedo (vapor). El vapor húmedo a presión es el método más efectivo de esterilización del material de vidrio. La temperatura dentro de la cámara del autoclave debe mantenerse en 121°C durante un tiempo de 15 min como mínimo.

## E. TRATAMIENTO DE RESIDUOS

Se debe establecer un sistema de identificación y separación de materiales contaminados y de sus recipientes para:

- Residuos no contaminados.
- Elementos cortantes.
- Material contaminado.

✓ **Descarte de residuos no contaminados:**

- Desechos generales son todos aquellos como papelería, envoltura, desechos de oficina, cocina, cafetería, etc. Estos serán descartados en los basureros para basura común, rotulados como basura común, ubicados en cada una de las áreas.
- Material reutilizable no contaminado como Erlenmeyer, probetas de vidrio, balones, etc., utilizados en la preparación de reactivos y medios de cultivo se pueden lavar sin descontaminación previa.

✓ **Tratamiento y descarte de elementos cortantes:**

Para la toma y procesamiento de muestras se utilizan hojas de bisturí estériles o cuchillo. En caso de usar hojas de bisturí, se colocan en su empaque de fábrica nuevamente, se corrobora integridad y al llegar al laboratorio se descarta en recipiente identificado para tal fin. Este recipiente, una vez lleno se descarta en la caja de residuos patogénicos.

✓ **Tratamiento y descarte de residuos contaminados:**

Manejo de material contaminado en el área de trabajo:

- Sobre las mesas de trabajo, los analistas deben disponer de pequeños recipientes autoclavables y debidamente rotulados. Cada uno de ellos debe contener cloro al 0,5% (5000 ppm) o bolsas de bioseguridad desechables para descartar.

- Material reutilizable (pipetas de vidrio, espátulas de Drigalsky).
- Material descartable (palillos de madera, hisopos, tips).
- Los recipientes para desechos deben ser descontaminados y lavados antes de su reutilización.

Descarte de muestras de alimentos y cepas:

- Los alimentos que se reciben para análisis serán eliminados en bolsas para residuos patológicos (bolsa roja).
- Las cepas de patógenos aisladas en el laboratorio, deberán ser descartadas como máximo una semana después de haberse generado el resultado final. El Laboratorio podrá almacenar copia de dichas cepas en su cepario si así lo requiere.

Eliminación de líquidos:

- El contenido líquido de las muestras debe ser eliminado en un recipiente con cloro al 0,5% (5000 ppm). El mismo debe estar identificado y correctamente rotulado. Dejar en reposo durante 24 h para permitir la desinfección completa de dicho material. El material así inactivado puede descartarse.

**NOTA:** en la tabla 5 se describe la preparación de solución de cloro al 0.1 % (1000 ppm) y al 0,5% (5000 ppm).

- Método alternativo: eliminar los desechos líquidos en un Erlenmeyer destinado a tal fin (rotulado correctamente), tapar y autoclavar a 121°C durante 30 min. El material así inactivado puede descartarse.

Eliminación de sólidos:

- Desechar el contenido sólido de los frascos plásticos, las esponjas y placas de cultivo en la caja de residuos patogénicos dentro de la bolsa de polietileno de color rojo destinada para tal fin.

- La misma se dispone en un recinto destinado para residuos patológicos y se completa hasta llenar su capacidad tras lo cual se cierra la bolsa con un precinto y luego la caja.
- La caja será recolectada por el Servicio de Recolección de Residuos Patológicos.

### **Descontaminación del material luego de su utilización:**

Los materiales destinados a descontaminación y eliminación deben colocarse en recipientes (bolsas de plástico autoclavables). El autoclavado es el método de preferencia para todos los procesos de descontaminación (mínimo: 30 min a 121°C). El autoclave debe llenarse de forma que se

favorezca la penetración de calor dentro de la carga (es decir, sin sobrecargarlo) y tomando la precaución de aflojar los tapones o las tapas y de abrir las bolsas.

Se autoclava todo el material en contacto con los cultivos microbiológicos (medios de cultivo líquidos o sólidos), incluyendo los recipientes reutilizables, antes de lavar y reacondicionar.

**NOTA:** se recomienda descontaminar todo el material antes de ser descartado. Especialmente el material asociado a muestras con screening positivo a bacterias patógenas.

**Tabla 5.** Recomendaciones para preparar soluciones de hipoclorito de sodio (cloro al 0,1% y 0,5%).

Concentración de solución desinfectante Para preparar 1 litro (1000 ml) de solución				
concentración de cloro disponible	0,1% (1000 ppm)		0,5% (5000 ppm)	
	Desinfección de superficies, pisos, utensilios, etc.		Desinfección de materiales contaminados (tips, medios de cultivo enriquecidos, etc.)	
	Cantidad de cloro líquido	Cantidad de agua	Cantidad de cloro líquido	Cantidad de agua
1%	100 ml	900 ml	500 ml	500 ml
3%	30 ml	970 ml	154 ml	846 ml
4%	25 ml	975 ml	125 ml	875 ml
5%	20 ml	980 ml	100 ml	900 ml
10%	10 ml	990 ml	50 ml	950 ml

- Verificar la concentración de cloro disponible en el rótulo del envase de hipoclorito de sodio.
- Utilizar siempre los elementos de protección personal requeridos, como guantes, barbijo y guardapolvo.
- Utilizar un recipiente adecuado para el volumen final de solución de cloro a preparar.
- Colocar el volumen de la solución de cloro recomendada en la tabla, de acuerdo con la concentración que indique el proveedor.
- Incorporar el volumen de agua indicado.
- Mezclar bien durante 10 segundos y esperar 30 min antes de usar la solución.
- Rotular el recipiente “Solución de cloro al 0,1 % - Desinfectante”.
- Almacenar donde NO reciba luz del sol.
- Preparar una nueva solución de cloro al 0,1 % todos los días.

#### **Advertencias:**

- No mezclar la solución de cloro con otros productos de limpieza.
- Evitar el contacto de la solución de cloro con la boca y los ojos.

# CAPÍTULO IV

## EQUIPOS, INSTRUMENTOS, MATERIALES Y MEDIOS DE CULTIVO

*Alejandra Rivero y Juan Cruz Chiarizia*

Laboratorio Compañía Bernal S.A.  
Laboratorio del establecimiento frigorífico 2062. Bernal Oeste, Argentina.

Este capítulo tiene como objetivo reconocer y describir la importancia del Equipamiento del laboratorio, establecer su identificación, instrucciones de uso, calibración, verificación y mantenimiento. El desarrollo de este capítulo está dirigido a laboratorios que trabajarán con riesgo biológico tipo 1 y 2.

## A. GENERALIDADES

Presentamos una lista de términos y conceptos que consideramos deben conocer los analistas de un laboratorio de planta frigorífica:

**Ajuste:** conjunto de operaciones realizadas sobre un instrumento de medición para que proporcione indicaciones prescritas correspondientes a los valores dados de la magnitud a medir. Es necesario para que la diferencia en los resultados se minimice. Despues de un ajuste el instrumento de medición debe ser calibrado nuevamente. En la actualidad la mayoría de los instrumentos requieren ajustes por personal especializado en el servicio que suelen realizarlo durante el proceso de calibración.

**Calibración:** conjunto de operaciones que permiten establecer, en condiciones específicas, si la medida obtenida por un instrumento es compatible con lo esperado y que es apto para su uso, con el fin de evitar desviaciones en los procesos de análisis.

La calibración suele ser realizada por un laboratorio externo, en lo posible acreditado. En la siguiente página web podrán encontrar proveedores acreditados para la calibración de equipos de laboratorio (<https://oaa.org.ar/entidades-acreditadas/>).

**NOTA:** proveedores de servicios de calibración y verificación de instrumentos:

- Edaci S.R.L. <https://edaci.com/>
- Mac S.R.L. <https://www.macsrl.com.ar/>
- Sahilices Hnos S.R.L. <https://www.sahilices.com.ar/>

La frecuencia de la calibración dependerá de: la naturaleza del equipo o instrumento, las condiciones de uso y la gravedad de las consecuencias de una falta de calibración en el resultado de ensayo (como ejemplo ver apartado de micropipetas). También se deben considerar las siguientes variables: condiciones ambientales (humedad), verificaciones intermedias realizadas por el personal, incertidumbre requerida, la historia previa del equipo o instrumento y las recomendaciones del fabricante. A modo de ejemplo véase la calibración de micropipetas, balanzas, termómetros, etc., detallado más adelante.

**Mantenimiento:** conjunto de operaciones que permiten que un equipo o sistema de medida esté en perfectas condiciones de uso. El mantenimiento de los equipos puede ser correctivo (corregir fallos, averías), preventivo (prevenir fallos, deterioros, averías o un mal funcionamiento) o predictivo (emplear técnicas que utiliza herramientas de análisis de datos para detectar anomalías en el funcionamiento y posibles defectos en los equipos y procesos).

**Metrología:** ciencia de las mediciones y sus aplicaciones. Su objetivo fundamental es la obtención y expresión del valor de las magnitudes, garantizando la trazabilidad de los procesos y la consecución de la exactitud requerida en cada caso, empleando para ello instrumentos, métodos y medios apropiados. La metrología tiene dos características muy importantes: el resultado de la medición y la incertidumbre de medida.

**Trazabilidad metrológica:** propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida. La referencia puede ser la definición de una unidad de medida, mediante

una realización práctica, un procedimiento de medida que incluya la unidad de medida cuando se trate de una magnitud no ordinal, o un patrón.

**Patrones:** medir significa comparar con una referencia. Esa referencia se conoce como patrón. Un patrón es una medida materializada, instrumento de medir, material de referencia o sistema de medición, destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad o uno o varios valores conocidos de una magnitud, a fin de transmitirlos por comparación con otros instrumentos de medición. Un ejemplo muy sencillo es el uso de una pesa patrón para la calibración de la balanza granataria donde los resultados obtenidos se analizarán para determinar si se encuentra dentro de las tolerancias aceptables como se explicará en dicho instrumento.

**Patrón de referencia:** patrón que posee las mayores cualidades metrológicas posibles ya sea en un lugar o en una organización dada, a partir del cual se pueden derivar las mediciones allí realizadas.

**Jerarquía de patrones:** En la imagen podemos visualizar la estructura jerárquica de los patrones como una pirámide en cuyo vértice se encuentran patrones correspondientes a las unidades de base del SI (SISTEMA INTERNACIONAL). Este es el ámbito de trabajo que corresponde al BIPM (Oficina Internacional de Pesas y Medidas).

Luego le siguen los patrones nacionales, custodiados, realizados y mantenidos por los Institutos Nacionales de metrología de cada país, en nuestro caso el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI).

En el siguiente escalón tenemos a los Patrones de Referencia que están a cargo de los laboratorios de calibración acreditados.

Por último, la base de la pirámide está constituida por los patrones del nivel operativo.



Figura 4. Estructura general de la Metrología

**Resolución:** mínima diferencia entre indicaciones de un dispositivo mostrador que puede ser significativamente percibida.

**Verificación:** aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados. El elemento puede ser, por ejemplo, un proceso, un procedimiento de medida, un material, un compuesto o un sistema de medida.

**Tabla 6.** Equipos e instrumentos indispensables en el laboratorio de microbiología de una planta frigorífica y su requerimiento de calibración y/o verificación.

EQUIPO/INSTRUMENTO	INDISPENSABLE	CALIBRACIÓN	VERIFICACIÓN
Balanza analítica	X*	X	X
Balanza granataria	X	X	X
Termómetro de inmersión	--	X	X
Pesas patrón	X*	X	--
Pipetas/Micropipetas	X*	X	X
Data Loggers	X	X	X
Dispensador	--	X	X
Autoclave	X	--	X
Cabina de seguridad biológica	X*	--	X
Flujo laminar	--	--	X
Estufas de cultivo	X	--	X
Heladeras	X	--	X
Baños termostáticos	X	--	X
Termómetro digital	--	X	X
Stomacher	X	--	X
Temporizadores	X	--	X
Lector de placas	--	--	--
Medidor de pH	X	--	X
Termociclador	X*	--	X
Freezer	X	--	--
Agitador de mesada	X*	--	--
Destilador de agua	--	--	--
Aire acondicionado	X	--	--

X\* Equipos que son indispensables para un laboratorio de planta que prepara sus medios de cultivo y trabaja con bacterias patógenas (riesgo biológico 2)

## A.1 Identificación de los equipos e instrumentos

Todos los equipos e instrumentos deben tener una identificación (ficha técnica) donde se recomienda incluir la siguiente información:

- ✓ Identificación
- ✓ Marca/Modelo/Serie
- ✓ Fecha de alta en el laboratorio
- ✓ Ubicación
- ✓ Certificado de calibración o verificación si corresponde
- ✓ Manual de instrucciones
- ✓ Parámetros para calibrar o verificar
- ✓ Mantenimiento preventivo
- ✓ Limpieza
- ✓ Historial: Datos de reparaciones, modificaciones y otros datos relevantes.

**Tabla 7.** Ejemplo de ficha técnica de un equipo o instrumento.

FICHA TÉCNICA DE EQUIPO /INSTRUMENTO	
Equipo/Instrumento	Data Logger
Inventario	E-51
Marca/Modelo	Escort
Serie	1141-0038
Fecha de alta	X/X/20XX
Ubicación	Sala de Incubación
Fecha de calibración	X/X/20XX
Fecha de verificación	X/X/20XX
Fecha de mantenimiento preventivo	X/X/20XX
Historial	-

A la ficha técnica se anexa información relevante: certificados de calibración, verificación, manual de instrucciones, etc.

En el historial se podrá dejar registro de datos del equipo/instrumento: reparaciones, modificaciones, baja, entre otros.

## A.2 Instructivos

Los instructivos son documentos técnicos que deben elaborarse en los laboratorios para el correcto mantenimiento de los equipos o instrumentos y deben incluir

como mínimo la siguiente información: limpieza, mantenimiento preventivo de funcionamiento y en caso de que corresponda, la verificación de los equipos e instrumentos del laboratorio. A continuación, presentamos las secciones que deben ser incluidas en los instructivos, aunque en algunos casos no todas resulten aplicables:

**Tabla 8.** Ejemplo de instructivo de un equipo o instrumento

INSTRUCTIVO	
OBJETIVO	Breve explicación del propósito del documento
ALCANCE	Campo de aplicación del documento
RESPONSABLE	Responsable de la ejecución
INSTRUCCIONES	Cuerpo del documento en el cual se describe la secuencia de actividades a desarrollar
REGISTROS	Formularios que genera el documento, su codificación en caso de que corresponda, el responsable de la confección, el responsable y el lugar del archivo de los registros, el tiempo de retención y disposición de estos
REFERENCIAS	Documentos vinculados al instructivo
ANEXOS	Documentación complementaria necesaria para la ejecución de algunas tareas se aclara en este ítem

## A.3 Registros

Todas las actividades que se realizan en el laboratorio generan registros cuya finalidad es evidenciar la actividad desarrollada para el mismo

**Tabla 9.** Ejemplo de registro de uso de un equipo o instrumento.

REGISTRO DE INSTRUCTIVO ESPECÍFICO AJUSTE Y VERIFICACIÓN DE MEDIDOR DE PH					
Formulario					
Equipo y electrodo asociado					
Fecha	Hora	Ajuste y verificaciones			Firma
		Buffer pH 4	Buffer pH 7	Observaciones	

## B. EQUIPOS

### B.1 AUTOCLAVE

El autoclave se utiliza para esterilizar medios de cultivo, elementos para uso en el laboratorio y para toma de muestra en planta. También pueden ser utilizados para esterilizar material contaminado. Los autoclaves operan con alta presión y temperatura para eliminar todo tipo de microorganismos, incluidas las esporas. Uti-

lizan vapor saturado superior a 98% para trasmisir su energía térmica a los elementos que se quieren esterilizar a presiones superiores a la de la atmósfera conocido como esterilización por calor húmedo. Los autoclaves pueden ser a gas (Chamberland) o eléctricos (digitales o automáticos) (Figura 5). Si bien los primeros son muy robustos y eficientes, actualmente se recomienda el uso de autoclaves eléctricos.



Autoclave tipo Chamberlain



Autoclave digital tipo Chamberlain



Autoclave automático

Figura 5. Ejemplos de autoclaves.

#### - Componentes de un autoclave:

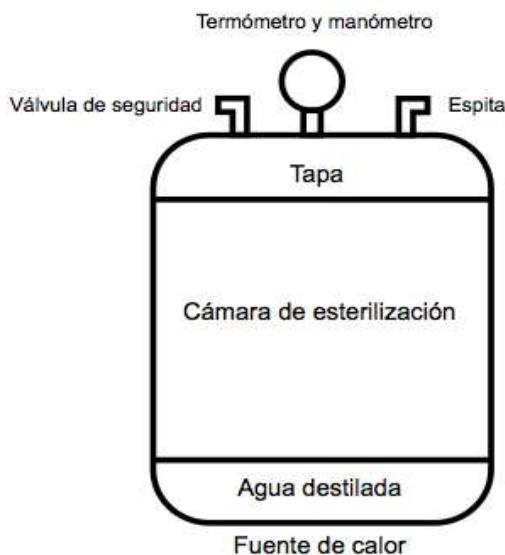
Según el tipo de autoclave se pueden describir diversos componentes, es por ello recomendable leer detenidamente las instrucciones del autoclave que se utilice en su laboratorio. A continuación enumeramos y describimos los componentes básicos de un autoclave con el objetivo de comprender su funcionamiento.

- ✓ **Cámara de esterilización:** espacio donde se colocan los objetos o elementos a esterilizar. Cuando el proceso de esterilización está en marcha se llena y presuriza con vapor.
- ✓ **Puerta o tapa:** permite aislar la cámara de esterilización del ambiente exterior. Normalmente dispone de seguros que impiden su apertura cuando la cámara

se encuentra presurizada. Hay puertas de operación manual y puertas, cuya apertura y cierre se controlan mediante mecanismos electromecánicos.

- ✓ **Termómetro:** instrumento que indica la temperatura a la que se realizan los procesos de esterilización en el autoclave, el rango de temperatura es de 100 a 200°C.
- ✓ **Manómetro:** dispositivo mecánico que indica cuál es la presión de vapor en la cámara de esterilización. La presión es expresada en libras/pulgada cuadrada, en kg/cm<sup>2</sup> o en atmósferas. El termómetro y manómetro pueden encontrarse en un mismo instrumento.
- ✓ **Válvula de seguridad:** dispositivo que impide que la presión de vapor aumente más allá de lo establecido.

- te por encima de un valor determinado.
- ✓ **Espita:** dispositivo utilizado para eliminar el aire durante el calentamiento, proceso denominado purga.
  - ✓ **Fuente de calor:** eléctrica.



**Figura 6.** Esquema simplificado con los componentes básicos de un autoclave.

#### - Funcionamiento del autoclave:

En primer lugar se debe constatar que haya agua suficiente dentro de la cámara. Se carga la autoclave y se aprieta la tapa manteniendo la espita de descarga abierta. Se ajusta la válvula de seguridad a la temperatura requerida y se conecta a la fuente de calor. Cuando el agua hierva, fluirá el vapor por la espita de descarga, arrastrando el aire caliente existente en la cámara. Se deja que salgan libremente el aire y el vapor hasta que se haya eliminado todo el aire (purga). Cuando se haya alcanzado esta fase, se cierra la espita. La presión se eleva en la cámara ( $1\frac{1}{2}$  atmósfera) hasta alcanzar la temperatura deseada ( $121^{\circ}\text{C}$ ). En ese momento comienza a fluir vapor por la válvula de seguridad y se mantiene la presión durante 15 min. El ciclo (temperatura, presión y tiempo) puede variar según el objetivo del proceso de esterilización. Al término del periodo de esterilización, se apaga la fuente de calor y se deja que la autoclave se enfrie. Se abre la espita muy lentamente y una vez que el manómetro lle-

gó a cero, se deja que el material se enfrie hasta alcanzar una temperatura adecuada para la manipulación.

**NOTA:** nunca se debe dejar enfriar el autoclave por mucho tiempo, ya que si no se abre se forma un vacío, el cual puede romper el material estéril.

**NOTA:** es muy importante eliminar todo el aire de los esterilizadores a medida que se introduce el vapor, porque las mezclas de aire y vapor retardan el calentamiento en la cámara y producen temperaturas finales más bajas generando zonas no estériles.

Actualmente, los autoclaves utilizan sistemas controlados por microprocesadores y cada una de sus válvulas y accesorios trabaja de acuerdo con programas preestablecidos de acuerdo con instrucciones almacenadas en la memoria del microprocesador. Su operación queda grabada en un sistema de registro, que permite revisar las distintas etapas del ciclo de esterilización. Cada fabricante incorporó sistemas de registro que son indispensables para el control de calidad.

Los procesos de esterilización se realizan siguiendo ciclos predefinidos que varían de acuerdo con el tipo de carga que se requiere esterilizar.

#### - Ciclos de autoclave utilizados con mayor frecuencia:

- ✓ **Material de vidrio y descartable:**  $121\pm3^{\circ}\text{C}$  durante 15 min. La duración de los ciclos depende de los volúmenes.
- ✓ **Medios de cultivo y reactivos:**  $121\pm3^{\circ}\text{C}$  durante 15 min,  $115\pm3^{\circ}\text{C}$  durante 15 min o según indicaciones del fabricante o instructivo técnico de referencia.

NOTA: toda esterilización de materiales, medios de cultivo y reactivos que se realiza en autoclave se efectúa de acuerdo con el instructivo del equipo, donde detalla los pasos que se siguen para el correcto uso. Además, se debe tener en cuenta las condiciones de seguridad.

NOTA: se recomienda que a cada ciclo de esterilización/descontaminación se le asigna un número de lote a fin de obtener una trazabilidad.

NOTA: se utiliza agua destilada para realizar la operación, de lo contrario la salinidad del agua puede causar inconvenientes en el funcionamiento del equipo.

#### - Requerimientos para la instalación de un autoclave:

- ✓ Un lugar con buena ventilación para remover el calor y la humedad que genera el equipo mientras se encuentra en operación.
- ✓ Espacios libres en la parte posterior y lateral para realizar los servicios técnicos que requiera a lo largo de su vida útil.
- ✓ El piso debe estar bien nivelado y construido con materiales que resistan la humedad y el calor.
- ✓ Instalación eléctrica: debe tenerse en cuenta la potencia requerida ya que podría ser significativamente alta. Los voltajes típicos requeridos por los autoclaves son 220 V, 60 Hz, o 380 V, 60 Hz trifásico.

#### - Criterios generales para la aprobación de autoclaves:

el laboratorio debe verificar para su uso los siguientes criterios de aceptabilidad:

- ✓ Determinar si el equipo cumple con el rango de tiempo y temperatura deseada.
- ✓ Comprobar la uniformidad en la distribución de calor según las condiciones de trabajo estipuladas para la misma, en el ensayo puede realizarse con carga o sin carga.
- ✓ Verificar que la temperatura se mantiene en el rango de trabajo durante todo el ensayo (estabilidad).

**- Verificación del proceso de esterilización:** para que un producto pueda considerarse estéril, es necesario verificar que todas las etapas que conforman el proceso de esterilización se hayan realizado correctamente. La validez y confiabilidad del proceso de esterilización en autoclaves se demuestra mediante evaluaciones sobre la temperatura, la presión, el tiempo, la humedad y el comportamiento general del equipo.

**a) Indicadores físicos.** Están diseñados para supervisar el funcionamiento de los autoclaves. Pueden ser instrumentos que controlan parámetros (termómetros, manómetros), y registran el desarrollo del proceso. Existen instrumentos, como Data Loggers, que son más exhaustivos en el control de los parámetros (tiempo y temperatura) y cuentan con un software donde se evidencian los registros de temperatura interior del equipo durante todo el ciclo de esterilización, los mismos pueden descargarse y archivarse.

**b) Indicadores químicos.** Son pruebas de tipo químico que cambian de color o de estado cuando se exponen a las diversas fases del proceso de esterilización. Entre los más conocidos se encuentran las cintas adhesivas indicadoras y/o integradores químicos. La migración de un color oscuro a lo largo de la tira de papel o hasta superar la marca aceptable (según lo indique el fabricante), indica una correcta temperatura en el ciclo de esterilización. Se debe tener en cuenta que la utilización de sólo indicadores químicos no garantiza que el proceso de esterilización se cumplió correctamente, ya que indica que se alcanzó la temperatura deseada, pero no se puede saber por cuánto tiempo.

**c) Indicadores biológicos.** Se consideran el mejor método para controlar la calidad de un proceso de esterilización. Están compuestos por microorganismos vivos que tienen una mayor resistencia a un determinado proceso de esterilización, o por reactivos químicos que reaccionan

ante proteínas específicas de este tipo de microorganismo. Para controlar el proceso de esterilización por vapor saturado, se utilizan, por lo general, esporas de *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 7953,  $10^6$  esporas), en diferentes presentaciones (tiras, ampollas, viales autocontenidos). La muestra de esporas se coloca en el autoclave junto con los materiales a esterilizar y, luego del proceso, se incuba y analiza. Un indicador biológico será positivo cuando exista un fallo en el proceso de esterilización. Estas pruebas están estandarizadas y los fabricantes señalan la forma de utilizarlas y de interpretar los resultados. Los indicadores biológicos por sí solos tampoco garantizan que el ciclo de esterilización cumple con todos los requisitos. La única forma es controlar todos los parámetros del ciclo de esterilización.

Se recomienda utilizar los indicadores de proceso y químicos en cada ciclo de esterilización y los biológicos al menos una vez al mes (la frecuencia se establecerá dependiendo de la cantidad de ciclos diarios).

**- Verificación externa:** la verificación lleva verificación de pérdidas de volumen (cuando sucedan cambios significativos del proceso) y ensayo de distribución de calor con y/o sin carga (estabilidad y uniformidad). La frecuencia se establece de acuerdo con el historial del equipo y al uso. Además de la verificación del proceso de esterilización se requieren controles respecto a las condiciones de funcionamiento y seguridad, los cuales pueden ser verificados por personal del laboratorio, por organismos o servicios contratados externamente.

**- Recomendaciones para el mantenimiento:** inspección de burletes, carcasa, mangueras y conexión eléctrica, verificación de válvulas de seguridad.

**NOTA:** ensayo de pérdidas, medición de espesores, inspección de componentes, verificación de presión de trabajo, análisis resistivo y verificación de válvulas de seguridad. El plazo es establecido por el laboratorio según la demanda de utilización, se recomienda anualmente, y es realizado por servicios contratados externamente.

## B.2 ESTUFAS DE CULTIVO

Las estufas de cultivo son equipos diseñados para mantener temperatura, atmósfera y humedad controladas, con el fin de conservar microorganismos vivos en un entorno que resulte adecuado para su crecimiento. Las estufas de cultivo varían en complejidad y diseño. Algunas únicamente controlan la temperatura, mientras que otras, además, controlan la composición atmosférica. Otras, incluyen sistemas de refrigeración. Dependiendo del diseño y las especificaciones requeridas, pueden encontrarse en el mercado estufas que controlan temperaturas desde -10°C hasta 75°C. Inclusive, estufas con forzador de aire que distribuyen el calor dentro de la cámara y acelerando el tiempo de recuperación térmica.



Figura 7. Estufa de cultivo.

**- Para su funcionamiento se requieren las siguientes condiciones:**

1. La toma eléctrica que alimenta la estufa no debe estar a más de 1,5 m del lugar seleccionado para la instalación de la estufa. La toma eléctrica normalmente debe suministrar un voltaje de 120 V, 60 Hz o de 220-240 V, 50/60 Hz y disponer de su respectiva acometida a tierra.
2. Espacio libre a los lados de la estufa y en la parte trasera del equipo, con el fin de permitir el paso de los cables y la ventilación requerida por la estufa para su funcionamiento normal. Dicho espacio se estima entre 5 y 10 cm.
3. Un lugar del laboratorio donde la variación de temperatura sea mínima.

**- Criterios generales para la aprobación de las estufas de cultivo:** el laboratorio debe verificar para su uso los siguientes criterios de aceptabilidad:

- ✓ Determinar el rango de temperatura deseado.
- ✓ Demostrar objetivamente la uniformidad en la distribución de calor según las condiciones de trabajo estipuladas para la misma.
- ✓ Demostrar objetivamente que no se produce deshidratación de las placas incubadas en la misma durante un período de 48 h superior al 15%.
- ✓ Demostrar objetivamente que la temperatura se mantiene en el rango de trabajo durante todo el ensayo (estabilidad).
- ✓ Conocer el tiempo máximo requerido en las condiciones más desfavorables para lograr las condiciones de régimen de trabajo.

**- Verificación de funcionamiento de las estufas de cultivo:** la verificación de las estufas se realiza mediante ensayos de distribución de calor (con carga). Estos incluyen: estabilidad, uniformidad y tiempo para conseguir las condiciones de equilibrio, deshidratación (cuando corresponda). Esta verificación se realiza por personal

contratado externo a la empresa. El plazo de verificación lo establece cada laboratorio de acuerdo con su uso.

**- Ensayo de distribución de calor:** con el fin de verificar que las estufas operan a las temperaturas de trabajo requeridas por los ensayos que involucran, se realiza sobre cada una un ensayo de distribución de calor. Inicialmente se realiza con el equipo sin y con carga, con el fin de establecer la estabilidad de la temperatura, la uniformidad de su distribución y el tiempo necesario para conseguir las condiciones de equilibrio. El estudio consiste en evaluar la distribución de calor en diferentes sectores de las estufas monitoreando las temperaturas de trabajo con la carga máxima utilizada por el laboratorio en cada una de ellas para determinar cuáles de estos sectores resultan operativos. El proveedor que realiza el servicio debe utilizar termocuplas o termoresistencias calibradas, con trazabilidad a patrones nacionales.

En caso de requerir una estufa a una temperatura diferente a la indicada para el ensayo de distribución de calor, se solicita un nuevo ensayo de distribución para la nueva temperatura antes de dar de alta el equipo (excepcionalmente puede considerarse válido el resultado de un perfil térmico aplicado a otra temperatura siempre y cuando la misma no exceda  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ).

**NOTA:** las temperaturas señaladas por los *displays* de las estufas de cultivo no se encuentran controladas y no evidencian la temperatura real dentro de las mismas. Para ello se utilizan Data Loggers calibrados o termómetros calibrados colocados en su interior.

A partir del ensayo efectuado, el proveedor emite un Informe donde se detalla:

- ✓ El solicitante del trabajo
- ✓ Características del equipo ensayado
- ✓ Descripción del ensayo

- ✓ Resultados y Conclusiones
- ✓ Observaciones y recomendaciones
- ✓ Fecha del informe
- ✓ Firma del responsable por el contenido del informe

Cada vez que ingresa una estufa de cultivo nueva al laboratorio, se efectúa el ensayo de aptitud de funcionamiento arriba descripto antes de aprobarla para su uso. Una vez aprobada para su uso se recomienda verificar la aptitud del funcionamiento cada 2 años. En caso de que el ensayo no resulte satisfactorio para el rango de funcionamiento especificado (por ejemplo  $35\pm1^{\circ}\text{C}$ ), no se autoriza el uso del equipo para el ensayo en cuestión. En caso de que se decida una baja temporal o definitiva del equipo se lo identifica con un cartel con la leyenda “FUERA DE SERVICIO A PARTIR DE”.

**NOTA:** el proveedor del servicio de verificación debe efectuar un nuevo ensayo de distribución de calor cada vez que la estufa de cultivo sea reparada por desperfectos técnicos que afecten a sus componentes electrónicos.

**- Comprobación de pérdida de humedad por deshidratación:** es necesario verificar que la calidad de los ensayos realizados con estufas no se afecta por la posible deshidratación de medios de cultivo durante el período de incubación. Para ello, el laboratorio debe realizar ensayos de comprobación de las estufas utilizadas para este parámetro (aplicable únicamente para equipos donde se incuben placas de Petri). Dicho ensayo consiste en incubar placas de Petri descartables con 15 ml de agar PCA durante 24 h y luego 48 h, y controlar el peso inicial y final de estas para determinar las pérdidas por deshidratación. El ensayo se efectúa a la temperatura de trabajo establecida para cada estufa y para cada estante. Se considera aceptable una pérdida por deshidratación inferior al 15% luego de las 48 h de incubación.

**- Determinación del tiempo necesario para conseguir las condiciones de equilibrio:** para determinar el tiempo necesario de cada estufa para lograr las condiciones de equilibrio dentro de la misma se procede a introducir material a incubar (atemperado) hasta completar su capacidad máxima (condición más desfavorable). Esto se efectúa con las estufas en régimen. Se agrega un Data Logger o termómetro calibrado al inicio del ensayo y se determina el tiempo necesario para que las mismas vuelvan a sus condiciones de equilibrio. El tiempo necesario para conseguir las condiciones de equilibrio de cada estufa se registra en un formulario específico. Dicho tiempo es considerado durante la ejecución de los ensayos adicionándolo al período de incubación descripto en el procedimiento técnico de referencia.

#### **- Control de temperaturas de las estufas de cultivo:**

A todos los equipos (estufas, baños termostáticos, heladeras, freezers y autoclaves) y salas (de incubación, de preparación de medios de cultivo, de preparación de muestras y de siembra) de las áreas del laboratorio, se les debe realizar un control de temperaturas.

El control de las temperaturas en el laboratorio es efectuado por personal del laboratorio utilizando termómetros digitales o registradores continuos de temperatura (Data Loggers) calibrados. Los termómetros son colocados en el interior de los equipos alternando entre los estantes que dispone o ubicados en un lugar estratégico del ambiente (no deben ser colocados debajo de la ventilación del aire acondicionado). Los valores tomados se deben registrar diariamente, lo cual puede ser una vez al día si el laboratorio posee de otro control que respalde las temperaturas (registradores continuos que se evalúan semanalmente), o se recomienda 3 veces al día (al inicio, durante y al finalizar la jornada laboral).

## **Recomendaciones para el mantenimiento preventivo de las estufas de cultivo:**

- ✓ Inspección de burletes.
- ✓ Inspección de conexión eléctrica.
- ✓ Inspección de puertas internas, bandejas y funcionamiento y apagado de forzadores en caso de apertura de puerta.
- ✓ Verificación de funcionamiento de alarmas, ciclos de programación e integridad de la cabina.

La frecuencia del mantenimiento preventivo debe ser determinada por el laboratorio de acuerdo con el uso de los

equipos. En caso de ser necesario, durante el mantenimiento preventivo se reemplazan burletes, tornillos, rejillas, iluminación, plásticos y cualquier componente que no se encuentre en óptimas condiciones. A su vez, se verifica el estado de funcionamiento de la botonera, sus diferentes funciones, ciclos de funcionamiento y su respuesta a la tecla de bloqueo. Puede, a su vez, considerarse la verificación de carga de gas refrigerante *in situ* o remitiendo el equipo a las instalaciones del proveedor.

**Tabla 10.** Ejemplo de instructivo para mantenimiento y limpieza de una estufa de cultivo.

Mantenimiento e inspección de integridad	Frecuencia	Agente de limpieza
Limpieza interior de estufas: inspección de elementos constituyentes (paneles de acrílico, imanes, integridad de las paredes, ausencia de óxido, dureza de burletes).	Al menos una vez al mes o en caso de ser necesario	Solución de detergente al 2%, enjuague con paño húmedo. Desinfección con solución de alcohol al 70%.
Limpieza exterior de estufas: Inspección de elementos constituyentes		Solución de detergente al 2%, enjuague con paño húmedo

## **B.3 CABINA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA Y FLUJO LAMINAR**

### **CABINA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA**

Las cabinas de seguridad biológica son equipos diseñados para controlar las micropartículas asociadas al manejo del material biológico, potencialmente tóxicos o infecciosos, que se generan en el laboratorio como resultado de actividades como la agitación y centrifugación, el uso y manejo de pipetas, la apertura de recipientes con presiones internas diferentes a la atmosférica.

Las cabinas fueron diseñadas para proteger al usuario, al ambiente y la muestra con la que se trabaja. En los laboratorios de plantas frigoríficas que realizan análisis de bacterias patógenas es recomendable tener una **Cabina de Seguridad Biológica Clase II**, que deberá ser verificada por una empresa externa antes de su puesta en funcionamiento y periódicamente se deben

realizar controles de ambientes, superficies y tubos UV.

Las cabinas de seguridad clase II son equipos diseñados para mantener un área de trabajo libre de partículas y de contaminantes (microorganismos) que puedan afectar la salud del trabajador, al medio ambiente y la muestra para análisis.

### **FLUJO LAMINAR**

Como alternativa a una cabina de bioseguridad se podrían utilizar cabinas de flujo laminar que genera un flujo de aire con velocidad y dirección uniforme, evitando turbulencias que conlleven una contaminación cruzada. Están compuestas de filtros HEPA (del inglés “High Efficiency Particle Arresting”) que son filtros de alta eficiencia capaces de retener partículas  $\geq 0,3 \mu\text{m}$  con una eficiencia mínima del 99,97%. Este equipamiento permite ser utilizado para la preparación de placas de medios de cultivos.



Figura 8. Flujo laminar.

Existen dos tipos de cabinas de flujo laminar:

- **Horizontal:** el filtro HEPA se encuentra colocado en la parte posterior de la cabina, por lo que el flujo del aire es unidireccional en forma de líneas paralelas horizontales, desde la parte posterior del equipo hacia el personal. Este equipo no debe ser utilizado para trabajar productos peligrosos o muestras que contengan patógenos, ya que durante la manipulación se pueden generar aerosoles que llegan al personal. Se recomienda utilizarlas para preparación de medios de cultivos.

- **Vertical:** el filtro HEPA se encuentra colocado en la parte superior de la cabina, generando un flujo de aire unidireccional que se mueve a través de las líneas paralelas verticales, posee una pantalla protectora transparente que cubre la parte frontal superior de la misma. No se recomienda para productos peligrosos o que puedan contener patógenos ya que el aire contaminado es expulsado al ambiente de trabajo.

Se utiliza para preparación de medios de cultivos o preparación de reactivos para PCR.

- **Verificación de cabinas de seguridad y flujos laminares:** se realiza por servicio técnico externo y la frecuencia depende de su uso.

El servicio se debe solicitar detallando las características del equipo a fin de recibir el mantenimiento adecuado. A con-

tinuación, se indican algunos procedimientos que realiza el servicio contratado:

- ✓ Certificación anual de acuerdo con los lineamientos de la Norma NSF 49.
- ✓ Cambio de motores.
- ✓ Cambio de ventiladores<sup>(\*)</sup>
- ✓ Cambio de filtro HEPA<sup>(\*)</sup>. La frecuencia de cambio depende de la intensidad de uso de la cabina y del sistema de control ambiental que se tenga instalado en el laboratorio. Si hay un buen control ambiental (por ejemplo: polvo), el filtro podría llegar a durar muchos años.
- ✓ Reparación del sistema electrónico de control: alarmas de control de flujo, posición de la ventana, controles de velocidad.
- ✓ Reparación y limpieza de válvulas reguladoras de flujo, ajuste de acoplos tipo campana.

(\*) Requieren procedimientos especializados de descontaminación previa.

**NOTA:** el servicio de mantenimiento de los flujos laminares no incluye el recambio de lámparas UV. La vida útil de éstas lámparas es de aproximadamente 7500 h, por lo que se recomienda sustituirlas anualmente o realizar una evaluación de efectividad de acuerdo con su uso.

**NOTA:** se recomienda realizar el recambio de filtros HEPA cada 5 años o según sugerencia del proveedor en función del historial de funcionamiento.

### - Verificación en el laboratorio de planta frigorífica

**Verificación del funcionamiento de filtros:** antes del ensayo se debe verificar la esterilidad de 5 placas de Petri con PCA. Se colocan las 5 placas con esterilidad verificada en cada uno de los extremos y en la parte central del equipo. Se destapan y se dejan en contacto con el flujo de aire de la cabina durante una hora. Transcurrido este período se cierran las placas y se incuban a  $35\pm1^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Funcionamiento adecuado: ausencia de desarrollo

bacteriano en todas las placas. En caso de haber desarrollo en alguna de las placas, se expresa el resultado y puede considerarse repetir la verificación para descartar contaminaciones involuntarias. De confirmarse el desvío, el equipo se deja fuera de servicio ya que la evidencia de presencia bacteriana se considera inadmisible.

**Verificación de luz UV:** se siembra una alícuota de solución que contenga un número conocido de microorganismos de una cepa pura de *Enterobacter aerogenes* en dos placas de Petri con agar PCA. Se expone una de las placas descubierta a la luz UV por un período determinado por el laboratorio, la placa restante sirve como control. Se incuban ambas placas durante 48 h a  $35\pm1^{\circ}\text{C}$ , transcurrido este tiempo, se efectúa el recuento de ambas placas considerándose como 100% al valor obtenido en la placa que no fue expuesta a la luz UV. Se considera que los tubos de luz UV funcionan correctamente si en la placa expuesta a la luz UV la reducción del recuento inicial comparado con la placa control no expuesta es de por lo menos un 99% de efectividad. La reducción será de un 100% cuando en la placa expuesta a la luz UV no se observa crecimiento.

#### - Verificación externa de cabinas de seguridad biológica y flujos laminares

Las cabinas de Clase II se encuentran reglamentadas por el Estándar NSF 49. El mismo define materiales, criterios de diseño y construcción, parámetros de operación y pruebas que permiten garantizar que la cabina es segura y adecuada para los trabajos que se realizan en ella. Se presenta a continuación la lista de pruebas que incluye el estándar mencionado. Detalles de estos deben consultarse en el Estándar.

El Estándar incluye las siguientes pruebas:

1. Estanqueidad.
2. Fugas de los filtros HEPA.
3. Aumento de temperatura.
4. Ruido.

5. Intensidad luminosa.
6. Vibraciones.
7. Protección al personal, al producto y ensayos biológicos de contaminación cruzada.
8. Estabilidad.
9. Velocidad del flujo vertical.
10. Velocidad del flujo de ingreso.
11. Patrones de humo.
12. Fugas del drenaje.
13. Funcionamiento del sistema motor/ventilador.
14. Sistema eléctrico.

#### - Recomendaciones para el mantenimiento de cabinas (frecuencia anual)

- ✓ Inspección de comando general.
- ✓ Inspección de funcionamiento correcto de alarmas y apagado de luz UV.
- ✓ Recorrido de ventana frontal.

#### Limpieza y desinfección de cabina y flujo laminar

1. Descontaminar la superficie de trabajo y las superficies interiores con alcohol 70%.
2. Limpiar el vidrio frontal y la superficie de la lámpara ultravioleta con solución de amonio cuaternario.
3. Limpiar superficies exteriores con paño húmedo y desinfectar con solución desinfectante adecuada.

Frecuencia: cada vez que se utiliza la cabina de bioseguridad o el flujo laminar se deberá limpiar y desinfectar el interior. El exterior se podrá realizar semanal o mensualmente de acuerdo con la demanda de uso del equipo. Además, se debe desinfectar todo material que haya estado en contacto con la cabina.

**NOTA:** para las rutinas de limpieza y desinfección se debe utilizar siempre elementos de protección personal.

#### B.4 HELADERAS Y FREEZER

Las heladeras y freezers son equipos destinados a mantener los medios de cultivo, soluciones, reactivos, kits y muestras a temperatura de refrigeración (2 a  $8^{\circ}\text{C}$ ,

usualmente se programan a 5°C) o congelación (-18°C).

**NOTA:** las temperaturas señaladas por los *displays* de las heladeras no se encuentran controladas, por lo que no se utilizan para evidenciar la temperatura real dentro de las mismas. Para ello se utilizan termómetros calibrados o Data Loggers calibrados colocados en su interior.

**- Verificación de funcionamiento de las heladeras y freezers:** el funcionamiento, tanto de las heladeras como de los freezers, es verificado con el registro diario de las temperaturas a las que operan y los registros generados por sus Data Loggers/termómetro digital.

En el caso de que alguno de estos equipos presente oscilaciones que resulten inadmisibles para la correcta ejecución de las funciones que lo involucran (se excede el rango de temperatura de trabajo permitido y éste no se puede regular mediante su termostato), se inhabilita temporalmente para iniciar una revisión de su funcionamiento. Durante esta etapa se evalúa la recurrencia del desvío, por ejemplo, mediante el uso de un Data Logger o termómetro adicional. De persistir el inconveniente se lo da de baja momentáneamente y se recurre al servicio técnico especializado para su reparación. Se debe identificar el equipo con la leyenda “FUERA DE SERVICIO A PARTIR DE” que inhabilita temporalmente hasta su reparación. Todo desvío de las condiciones normales de funcionamiento, como también bajas temporales se debe registrar en el formulario correspondiente al equipo. Una vez reparado el equipo inhabilitado y antes de que se dé el alta definitiva, se verifica el correcto funcionamiento monitoreando su comportamiento durante por lo menos 24 h utilizando un Data Logger/termómetro. Se evita la sobrecarga tanto de las heladeras como de los freezers para permitir una correcta circulación de aire en su interior.

**- Verificación de pérdida de humedad por deshidratación:** para verificar que la calidad de los ensayos donde se involucra el uso de heladeras no es afectada por la posible deshidratación de medios de cultivo listos para su uso y almacenados en ellas, se efectúan ensayos de comprobación para este parámetro. Se realiza una verificación de deshidratación utilizando, al igual que como se explica en estufas de cultivo, placas de Petri descartables de 15 ml de agar PCA.

**- Verificación de deshidratación en tubos de ensayo:** además del ensayo de verificación de pérdida de humedad por deshidratación con placas de Petri, se realizan con tubos de ensayo. Se toman 10 tubos de ensayo con aproximadamente 7 ml de medio de cultivo como podría ser Agar TSI en pico de flauta. Se registra el peso inicial de cada tubo. Los tubos se colocan dentro de la heladera a verificar, indicando el estante seleccionado. Se dejan almacenados durante 30 días. Transcurrido este tiempo se registra nuevamente el peso y se calcula el porcentaje de deshidratación sufrido en cada uno y el promedio para toda la tanda. Se considera admisible una pérdida de humedad del 5% tanto en placas listas para usar como en tubos de ensayo con medio listo para usar.

**NOTA:** el ensayo se efectúa sobre las heladeras utilizadas para el almacenamiento de medios de cultivo preparados. También se puede usar cualquier otro medio de cultivo para cualquiera de los ensayos anteriores.

**- Limpieza y mantenimiento del equipo:** se recomienda una limpieza de al menos una vez al mes con solución de detergente al 2% y rociado con solución desinfectante. Durante el mantenimiento preventivo se verifica el estado general del mismo y la necesidad de reemplazar piezas constitutivas del mismo, burletes, rejillas de forza-

dores de aire, termostato, etc. Efectuados los trabajos de mantenimiento preventivo se considera al mismo cumplido. Siempre todo debe ser registrado en su formulario correspondiente.

## B.5 TERMOCICLADOR

El termociclador es el equipo utilizado para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR es una valiosa técnica de análisis de alimentos y tiene múltiples aplicaciones, desde la detección de microorganismos patógenos hasta la detección de organismos genéticamente modificados (GMO) o identificación de especies animales. Actualmente, es habitual disponer de un termociclador para realizar PCR en los laboratorios de plantas frigoríficas.

La PCR es un técnica *in vitro* eficiente y rápida para la amplificación de secuencias específicas de ADN o ARN. Los kits de PCR y los equipos disponibles en nuestro país se detallan en el capítulo VIII del presente manual. Para el uso, la limpieza y el mantenimiento preventivo de cada termociclador se recomienda respetar rigurosamente las indicaciones del fabricante.

## B.6 DESTILADOR DE AGUA

El agua es el reactivo más importante dentro del laboratorio y está presente en la mayoría de los procesos que se utilizan en él, desde el lavado del material hasta el llenado del autoclave. La mayoría de los casos en los requisitos generales de laboratorio deben tener en cuenta el efecto de las incrustaciones utilizando agua potable simple. Las impurezas en el agua afectan

la eficiencia, el mantenimiento y la vida útil de los equipos. Por ejemplo, los baños termostáticos se encuentran en muchos tipos de laboratorios. Habitualmente se suele pensar que el agua potable será suficiente para calentar los baños, ya que el objetivo es mantener las temperaturas constantes y reguladas. Si bien esto es cierto, la suciedad es un problema importante y afectará el mantenimiento y la vida útil del equipo. Por otro lado, si el agua es muy pura, puede producirse óxido. El agua desionizada (o desmineralizada), el agua destilada y el agua ultrapura son los tipos más comunes en el laboratorio. El uso de agua de calidad en los análisis es capaz de minimizar y/o evitar errores analíticos, reducir el desgaste de los instrumentos de medida y proporcionar resultados confiables.

El laboratorio puede adquirir el agua comercialmente estableciendo requisitos de compra y solicitando el certificado de calidad correspondiente para avalar el cumplimiento de estos requisitos, o producir su propia agua de grado microbiológico sometiendo el agua corriente de red a un proceso de ósmosis inversa. El agua producida es posteriormente almacenada en bidones plásticos limpios, previamente desinfectados con soluciones de alcohol al 70% y luego rotulados, identificando su contenido y número de lote. Con el fin de poder asegurar la calidad del agua que se utiliza en el laboratorio, es necesario que la misma cumpla con los requisitos, tanto si el agua es adquirida comercialmente, como la obtenida por el laboratorio, por lo cual deben someterse a controles de calidad (Tabla 11):

**Tabla 11.** Controles de calidad del agua que se utiliza en el laboratorio.

DETERMINACIÓN PARA ANALISIS DE AGUA DESTILADA	LÍMITES RECOMENDADOS (APHA, USDA, ISO)	FRECUENCIA
Recuento de bacterias heterótrofas a 22°C durante 68±4h	100 UFC/ml (máx 1000 UFC/ml)	Cada lote
pH	5,5-7,5 a 25°C	Cada lote
Cloro Residual	< 0,1 ppm	Cada lote
Conductividad	1 S/cm a 25°C (máx 25 S/cm a 25°C)	Cada lote
Amoníaco / Nitrógeno orgánico	< 0,1 ppm	Mensual
Metales pesados (totales): Cadmio, Cromo, Cobre, Níquel, Plomo y Zinc.	< 0,1 mg/l	Anual
Metales pesados (por separado): Cadmio, Cromo, Cobre, Níquel, Plomo y Zinc.	< 0,05 mg/l	Anual

Para mantener la trazabilidad del agua utilizada en el laboratorio, cada lote de agua ya sea, adquirida comercialmente o producida por el equipo de filtración se designa con un número correlativo. En caso de incumplimiento de estos se investigan las causas y se corrige el defecto.

**NOTA:** para las determinaciones que no se efectúan en el laboratorio, se enviarán muestras de agua a algún laboratorio de ensayo aprobado como proveedor de servicios de ensayos para las determinaciones a efectuar. Los informes de ensayo remitidos por el proveedor son revisados y conservados en el laboratorio.

#### - Determinaciones:

- ✓ Determinación del número total de Bacterias Heterótrofas por ml de agua: para efectuar esta determinación se siguen las instrucciones de la metodología Recuento de bacterias aerobias totales en aguas.
- ✓ Determinación de pH: Se vierten aproximadamente 200 ml de la muestra en un vaso de precipitado y se determina el pH. Se tolera una variación de pH de 5,5-7,5 a 25°C.
- ✓ Determinación de cloro residual total: Para la determinación del cloro residual se utiliza un kit comercial cuyo límite sea

0,1 ppm o inferior. Se considera cumplido este requisito cuando el valor de cloro residual sea menor que 0,1 ppm.

- ✓ Determinación de conductividad: se procede según el instructivo del equipo utilizado. Se recomienda un valor en el orden de 1 S/cm y no más de 25 S/cm determinados a 25°C.

**NOTA:** para la evaluación de límites de las determinaciones se toman las referencias del *Standard Methods for the Examination of Water & Waste water*, APHA.

## B.7 BAÑOS TERMOSTÁTICOS

Los baños termostáticos son equipos que permiten calentar o mantener la temperatura constante en sistemas de reacción, posibilitando que haya un preciso control de las temperaturas. En el laboratorio suele utilizarse para calentamiento de reactivos, fusión de sustratos o incubación de cultivos. Se utilizan diferentes tipos de baños de agua dependiendo de la aplicación. Para todos los baños de agua, se puede utilizar hasta 99,9°C. Cuando la temperatura está por encima de 100°C, se pueden utilizar métodos alternativos tales como baño de aceite, baño de silicona o baño de arena para ciertas reacciones químicas a altas temperaturas.



Figura 9. Baño termostático.

**- Baños termostáticos con agua circulante:** los baños termostáticos con agua circulante son ideales para mantener la uniformidad y consistencia de la temperatura, por ejemplo, para ensayos enzimáticos y serológicos. El agua se hace circular a fondo por todo el baño, dando como resultado una temperatura más uniforme.

**- Baños termostáticos de agua no circulante:** este tipo de baño de agua se basa principalmente en la convección. Por lo tanto, es menos preciso en términos de control de temperatura. Además, hay complementos que proporcionan la agitación a baños de agua no circulantes para crear una transferencia de calor más uniforme.

**- Baños termostáticos con sacudido:** los baños termostáticos con sacudido tienen un control adicional para agitar los líquidos. Esta función se puede activar o desactivar. En las prácticas microbiológicas, la agitación constante permite que los cultivos celulares cultivados en líquido se mezclen constantemente con el aire.

#### Verificación de las condiciones de funcionamiento de los baños termostáticos:

**- Ensayo de distribución de calor:** se realiza antes de aprobar los baños termostáticos para su uso en el laboratorio. El estudio consiste en evaluar la homogeneidad y estabilidad en diferentes sectores de los baños monitoreando las temperaturas de trabajo con carga máxima. Debe ser efectuado por un proveedor aprobado para tal fin. Se debe realizar este ensayo en las siguientes situaciones:

- ✓ Cada vez que ingresa un baño termos-

tático nuevo al laboratorio

- ✓ Al utilizar una temperatura diferente a la indicada (excepcionalmente puede considerarse válido el resultado de un perfil térmico aplicado a otra temperatura siempre y cuando la misma no exceda  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ).
- ✓ Al cambiar un cabezal.

Una vez aprobado para su uso, se verifica la aptitud del funcionamiento repitiendo el ensayo nuevamente en un período de tiempo establecido por el laboratorio de acuerdo con la utilización de este. En caso de que el ensayo no resulte satisfactorio para el rango de funcionamiento especificado, no se autoriza el uso del equipo.

**- Determinación de la estabilidad durante el uso:** se introduce en cada baño un termómetro con el cual se verifica la temperatura de operación en forma diaria o Data Logger calibrado y programado para tomar lecturas de temperatura en un determinado tiempo. Transcurrido el tiempo del ensayo se retira el Data Logger y se procesan los datos obtenidos.

**NOTA:** las temperaturas señaladas por los *displays* de los baños termostáticos no se encuentran controladas por lo que se no se utilizan para evidenciar la temperatura real dentro de los mismos. Se utilizan únicamente como referencia de temperatura de programación.

**- Criterios generales para la aprobación de baños termostáticos:** el laboratorio debe determinar los siguientes criterios de aceptabilidad para la aprobación de un baño termostático:

- ✓ Demostrar objetivamente la uniformidad en la distribución de calor según las condiciones de trabajo estipuladas para la misma.
- ✓ Demostrar objetivamente que la temperatura se mantiene en el rango de trabajo durante todo el ensayo (estabilidad).

El correcto funcionamiento de los baños termostáticos resulta evidenciado por el registro de las temperaturas que se originan durante el uso. En el caso de que se presenten oscilaciones de temperatura que resulten inadmisibles para la correcta ejecución de los ensayos que se efectúan, es decir, que las temperaturas registradas estén fuera del rango establecido, éstos son regulados nuevamente para comprobar la recurrencia del problema. De persistir el inconveniente, se da de baja momentáneamente al equipo en cuestión y se recurre al servicio técnico especializado para su control y reparación. Una vez reparado el equipo y antes de darle el alta definitiva, se verifica su correcto funcionamiento monitoreando su comportamiento durante por lo menos 24 h. Luego se procede a repetir el ensayo de distribución de calor.

**NOTA:** para evitar la precipitación de sales del agua del baño por acción del calor que luego resultan difíciles de remover, se emplea agua destilada o desmineralizada. **NOTA:** con el fin de evitar desvíos respecto del normal funcionamiento de los baños termostáticos, el personal del laboratorio no se encuentra autorizado a regular el funcionamiento de sus cabezales de ninguna forma. Únicamente se autoriza la utilización de los botones de programación de la temperatura de uso.

- **Limpieza:** para la limpieza de los baños termostáticos se recomienda seguir las instrucciones del fabricante. Sin embargo, se sugiere el siguiente esquema de mínima:

- ✓ Limpieza de gradillas: dos veces al mes y en caso de que se requiera.
- ✓ Limpieza exterior del baño dos veces al mes y en caso de que se requiera.
- ✓ Desinfección: debe ser con una sustancia apta como detergente neutro al 2% o alcohol al 70% y secado con un paño húmedo o papel absorbente.

## B.8 STOMACHER

Es un equipo triturador de acción de batido y agitación para la homogeneización de muestras directamente en bolsas estériles. Puede tener visualización digital de velocidades y tiempos o se gradúan manualmente.



Figura 10. Stomacher.

- **Limpieza y mantenimiento preventivo:** suele limpiarse antes y luego de su uso con paño con agua y rociado con solución desinfectante o solución de alcohol al 70%. Estos equipos no requieren ningún mantenimiento preventivo específico. En ocasiones puede considerarse la lubricación de las paletas o la reposición del burlete.

## B.9 AGITADOR DE MESADA

El agitador de mesada es un dispositivo que se utiliza para mezclar líquidos de forma rápida y eficiente. También se lo conoce como agitador de trompeta o agitador de remolino.

### - Tipos

- ✓ manual: se utiliza en laboratorios pequeños.
- ✓ electrónico: controla mediante un panel y se utiliza en laboratorios más grandes o en aplicaciones más exigentes.

También existen agitadores de mesa con diferentes tamaños y formas de la trompeta, para adaptarse a diferentes tamaños y formas de recipientes.

## B.10 AIRE ACONDICIONADO

El equipo de aire acondicionado permite mantener un control y ajuste de las condiciones termo-higrométricas. Son necesarios para proporcionar un ambiente controlado y estable para el trabajo con microorganismos. Estos equipos proporcionan una temperatura, humedad y flujo de aire controlados. En algunas situaciones se pueden requerir determinadas condiciones de temperatura o humedad, en estos casos los parámetros vendrán fijados por criterios del personal del laboratorio.

Las áreas del laboratorio suelen operar en un rango de temperaturas de 18°C a 25°C especialmente para mantener, por ejemplo, los medios de cultivos en un rango de temperaturas recomendadas por el fabricante. Se recomienda mantenerlo programado a 22°C.

**Mantenimiento:** control de presión y carga de gas, por personal externo. Se recomienda una vez al año.

**Limpieza:** inspección y lavado de filtros. Se debe tener en cuenta que el lavado de los filtros se debe realizar con esponja suave para no generar daños. Colocar los filtros una vez que se encuentren totalmente secos. Frecuencia de limpieza al menos una vez al mes.

**NOTA:** se recomienda que el sistema de aire acondicionado sea independiente y exclusivo de cada sector.

**NOTA:** en el caso de que la temperatura de la sala/sector se encuentre por debajo del umbral de tolerancia, se deberá incrementar el valor de temperatura a fin de cumplir con los rangos. Caso contrario, si se encuentra por encima del rango de tolerancia, se deberá disminuir.

Tabla 12. Ejemplo de registro de mantenimiento y limpieza de un aire acondicionado.

Registro de limpieza y mantenimiento de aire acondicionado					
Fecha	Inspección visual de la integridad	Limpieza de filtros	Mantenimiento	Observaciones	Responsable

Tabla 13. Ejemplo de registro para el control de temperatura de un aire acondicionado.

Registro de control de temperaturas del aire acondicionado				
Fecha	Hora	Temperatura °C	Observaciones	Responsable

## C. INSTRUMENTOS

### C.1. BALANZAS

La balanza es un instrumento que mide la masa de un cuerpo o sustancia, utilizando como medio de comparación la fuerza de la gravedad que actúa sobre el cuerpo. En el laboratorio se utiliza para pesar mezclas de componentes en proporciones predefinidas y pesos específicos, como la preparación de los medios de cultivo.

Las más comunes a utilizar en el laboratorio, son las siguientes:

#### C.1.1 Balanza analítica

Funciona mediante la comparación de masas de peso conocido con la masa de una sustancia de peso desconocido. Dispone de una caja externa que protege la balanza de las interferencias, como corrientes de aire que pudieran presentarse

en el lugar donde se encuentra instalada. En la actualidad, se considera que una balanza analítica es aquella que puede pesar diez milésimas de gramo (0,0001 g) o cien milésimas de gramo (0,00001 g); tienen una capacidad que alcanza generalmente hasta los 200 g.



Figura 11. Balanza analítica.

**- Encendido y verificación del estado de calibración:** antes de encender la balanza para su uso, el personal de laboratorio debe verificar que esté nivelada. Para nivelar la balanza se regulan las perillas (apoyos) ubicadas en los laterales del equipo hasta centrar la burbuja de aire dentro del círculo del nivel. Una vez que la balanza se encuentra nivelada se procede a encender el equipo conectándolo a la fuente. Se aguarda aproximadamente 15 min para que el equipo se estabilice.

**- Frecuencia de verificación:** antes de cada uso el personal de laboratorio verifica el estado de calibración de la balanza utilizando una pesa patrón externa de valor nominal con trazabilidad a patrones nacionales o internacionales (el tipo de pesa se determina de acuerdo con los kg de la balanza). La medición con pesas externas permite determinar los desvíos remanentes de indicación que el sistema de ajuste inicial no puede corregir.

- ✓ Cuando se coloca una pesa de 20 g el error máximo tolerado es  $\pm 0,001$  g.
- ✓ Cuando se coloca una de 50 o 100 g el error máximo tolerado es de  $\pm 0,002$  g.

Las pesas se manipulan con sumo cuidado, utilizando pinzas o guantes provistos para tal fin y se conservan en su estuche original.

**- Recomendaciones para el mantenimiento de la balanza analítica:** por tratarse de un instrumento de medición delicado que puede resultar afectado en lo que se refiere a su exactitud y precisión en la expresión de los resultados que emite, se recomienda evitar las siguientes situaciones:

- ✓ El traslado innecesario de la balanza a cualquier lugar que no sea el asignado para ella.
- ✓ El manejado del aparato y de las pesas externas por cualquier persona que desconozca los recaudos necesarios que se deben tomar para operar este instrumento.
- ✓ Limpieza del instrumento por personal externo al del laboratorio.
- ✓ Designar la limpieza del equipo a un responsable que pertenezca al laboratorio.
- ✓ Colocar sobre el plato cualquier peso que resulte superior.
- ✓ Manipular las pesas utilizadas durante la verificación del estado de calibración externa con las manos desnudas. Para ello se utiliza pinzas o guantes provistos para tal fin.

**- Limpieza:** al momento de utilizar la balanza el platillo de pesaje debe estar libre de polvo o suciedad. La limpieza se efectúa con una pieza de tela limpia que puede estar humedecida con agua destilada. Si es necesario retirar alguna mancha, se puede aplicar un detergente apto. También se puede usar un pincel de pelo suave para remover las partículas o el polvo que se hubiesen depositado sobre el platillo de pesaje.

- ✓ Frecuencia de limpieza: antes y después de cada uso, y cuando se observa suciedad.
- ✓ Agente de limpieza: alcohol 70% o solución de amonio cuaternario 2%.

**NOTA:** el fabricante brinda instrucciones para el tipo y modelo de balanza.

### C.1.2 Balanza granataria

Se utilizan si no se requiere gran precisión.



Figura 12. Balanza granataria.

**- Ajuste y verificación de mediciones:** el personal de laboratorio verifica que la balanza a utilizar se encuentre nivelada antes de encenderla. Para nivelar la balanza se regulan las perillas (apoyos) ubicadas en los laterales del equipo hasta centrar la burbuja de aire dentro del círculo del nivel. Una vez que la balanza se encuentra nivelada se procede a encender el equipo conectándolo a la fuente. Finalizado el ajuste el display marca cero y el equipo está listo para ser usado, teniendo en cuenta la capacidad máxima de la balanza.

**NOTA:** las balanzas Marca Sartorius poseen una pesa interna con la cual puede efectuarse el ajuste del instrumento manteniendo presionada la tecla CAL.

**- Frecuencia de verificación:** por lo menos una vez a la semana el personal de laboratorio verifica el estado de calibración de las balanzas utilizando una pesa patrón externa de valor nominal. Puede ser de 20 gramos, 50 gramos y/o 100 gramos con tra-

zabilidad a patrones nacionales o internacionales. La medición con pesas externas permite determinar los desvíos remanentes de indicación que el sistema de ajuste inicial no puede corregir. Cuando se coloca la pesa de un kilo el error máximo tolerado es de  $\pm 0,2$  g (Organismo Internacional de Metrología Legal R76-1:1992). Cuando se coloca una pesa de 20, 50 o 100 g el error máximo tolerado es de  $\pm 0,1$  g.

**- Recomendaciones para el mantenimiento de la balanza granataria:** por tratarse de instrumentos de medición delicados, que pueden resultar afectados en lo que se refiere a su exactitud y precisión en la expresión de los resultados que emiten, se recomienda evitar las mismas situaciones descriptas para balanzas analíticas. En caso de que la balanza no responda al ajuste interno por razones ambientales (esto queda demostrado en el display durante el mismo), ya sea corrientes bruscas de aire, vibraciones durante el ajuste, etc., se procede a eliminar estos factores cuando ello resulte posible.

**- Limpieza:** ver limpieza de balanza analítica.

**- Calibración de las balanzas:** el proceso de calibración de balanzas debe ser realizado por personal capacitado específico para esta actividad. En el momento que se solicita el servicio de calibración se debe constatar que los patrones se encuentren dentro de los parámetros requeridos por el laboratorio, como por ejemplo los valores de tolerancia, incertidumbre y trazabilidad de los patrones de referencia que utilizan.

Tabla 14. Ejemplo de registro de ajuste y verificación de balanzas.

REGISTRO DE AJUSTE Y VERIFICACIÓN DE BALANZAS					
Formulario					
Equipo y código de pesas					
Fecha	Hora	Verificación		Resultado de verificación	Firma
		20 g	100 g		

## C.2 PESAS PATRÓN

Una pesa patrón consiste en un patrón de medición que se encarga de materializar la masa. La OIML se encarga de establecer las distintas clases de pesas.



Figura 13. Pesas patrón.

**- Calibración:** dado que las pesas exigen cierta precisión y veracidad en los valores de medición que proveen por su influencia sobre la calidad final del resultado de los ensayos en los que son utilizados, o requieren la conservación en el tiempo de alguna característica propia, estos deben ser calibrados en laboratorios de calibración externos. Para la calibración de pesas se utiliza la determinación de masa convencional y susceptibilidad magnética. El intervalo de calibración se define según las recomendaciones del fabricante y la frecuencia de uso.

**- Recomendaciones para el mantenimiento de pesas:** se recomienda, al menos una vez al año, verificar el estado de la campana. Inspección de marcas o huellas dactilares, grasa y polvo superficial.

## C.3 TERMÓMETROS

Los termómetros son instrumentos utilizados para medir la temperatura con un alto nivel de exactitud. En los laboratorios podemos encontrar distintos tipos:

### - Termómetro de inmersión

Es un instrumento conformado por un tubo largo de vidrio con un bulbo en uno de sus extremos. En el exterior, tiene la

escala numérica en °C, puede medir temperaturas que van desde los -20°C hasta los 200°C. El líquido que se dilata dentro del cuerpo del termómetro es alcohol que está teñido de rojo para facilitar la observación de la marca.

### - Termómetro digital con termocupla

Es un dispositivo diseñado para la medición de temperatura, basado en efectos termoeléctricos, lo que le permite medir temperaturas hasta los 200°C e inferiores a los -50°C, dependiendo los materiales con los que se fabrique.

### - Data Logger

Es un instrumento diseñado para registrar temperatura y humedad. Tiene pantalla digital. El equipo almacena en su memoria los valores que pueden ser luego impresos en forma de tabla con su correspondiente fecha y hora, mediante el software. Posee un *display* digital multifuncional donde se observa la información sobre el estado de los ciclos, estadísticas y condiciones de la alarma informando humedad máxima/mínima, temperatura máxima/mínima y promedio, tiempo fuera de especificación y valor actual. De acuerdo con el modelo tiene una temperatura de trabajo -40 a +70°C.

**- Calibración de termómetros:** los termómetros utilizados en el laboratorio deben ser calibrados antes de su uso en un organismo capaz de emitir certificados de calibración trazables a patrones nacionales de temperatura. Se recomienda que se encuentren acreditados bajo norma IRAM-ISO/IEC 17025 vigente en magnitud y rango. Los termómetros se envían al proveedor de servicios de calibración para ser calibrados en los puntos en los que habitualmente se utilizan. Con los puntos seleccionados se generan rangos de uso, los cuales se utilizan para realizar las correcciones de temperatura correspondientes (ver más adelante). La validez de la calibración dependerá del uso y el historial del equipo, usualmente cada 2 años.

**NOTA:** la ejecución de reparaciones sobre los termómetros invalida la calibración efectuada, por lo que la misma debe repetirse antes de volver a darlo de alta.

**- Verificación de funcionamiento de termómetros (digital y Data Logger):** la verificación de funcionamiento de los termómetros se efectúa a través de un proveedor aprobado para el servicio. Para el caso de los termómetros se realiza en un punto de uso más frecuente, con el fin de verificar que los rangos de temperatura en los que se utiliza, se mantienen estables y dentro de los valores aceptables.

**- Recomendaciones para el mantenimiento de termómetros:** se recomienda realizar el servicio de mantenimiento al menos una vez al año. Generalmente antes de efectuar la verificación de funcionamiento de los termómetros se lleva a cabo una inspección de la integridad de estos. En caso de que se detecten potenciales roturas por desgaste se efectúa una pronta reparación para evitar la baja por desperfectos mayores. Durante el mantenimiento preventivo se inspecciona:

- ✓ La integridad de la sonda de temperatura buscando roturas, cortes, puntos sin aislamiento o falsos contactos.
- ✓ La integridad de la columna del termómetro de inmersión buscando cortes en la misma.
- ✓ La integridad de la carcasa de los equipos.
- ✓ La pila o batería en busca de posibles sulfataciones.
- ✓ El historial de calibración, el mantenimiento preventivo, la verificación y estado general de cada uno de los termómetros, incluyendo las posibles reparaciones efectuadas sobre los mismos se podrán registrar en un formulario.

**NOTA:** de acuerdo con la necesidad del laboratorio estos termómetros son indispensables o no, por lo cual deberá determinar para qué tipo de actividad se requiere.

#### C.4 MICROPIPETAS

Las micropipetas son instrumentos diseñados para succionar y transferir pequeños volúmenes de líquido.

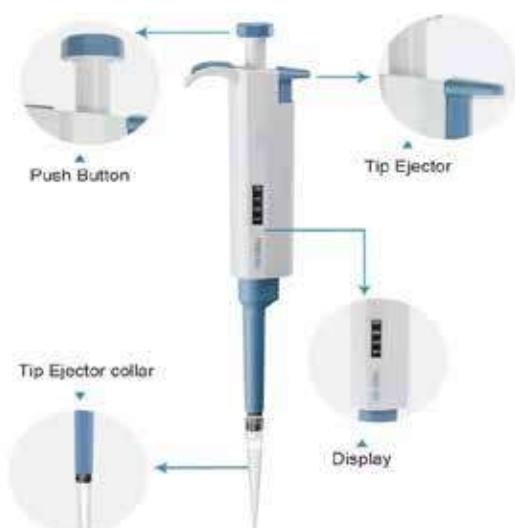


Figura 14. Micropipeta automática y sus partes.

#### Funcionamiento y correcta utilización de una micropipeta

##### i) Seleccionar la micropipeta que se requiere

Actualmente podemos encontrar pipetas de volumen fijo o variable, se recomienda utilizar pipetas de volumen variable ya que podemos ajustar distintos rangos; por ejemplo: entre 2-20  $\mu\text{l}$ , 10-100  $\mu\text{l}$ , 20-200  $\mu\text{l}$ , 100-1000  $\mu\text{l}$ , 1-10 ml, entre otros.

El rango de trabajo suele ser entre el 10 y 100% de su volumen nominal máximo (líquido que es capaz de medir la micropipeta)

**NOTA:** la precisión de las micropipetas disminuye al acercarnos a su volumen de trabajo mínimo.

## ii) Seleccionar el volumen a dispensar

En las micropipetas se puede seleccionar el volumen a utilizar, para ello disponen de ruedas de ajuste del volumen en la parte superior del instrumento.

**NOTA:** según el modelo o marca, podemos encontrar diferencias en la utilización, por lo cual se recomienda siempre consultar al fabricante.

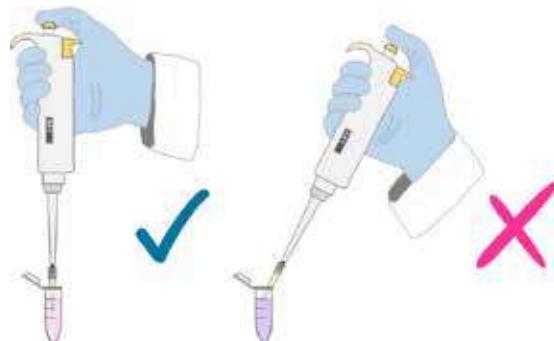


Figura 15. Correcta utilización de las micropipetas automáticas.

## iii) Seleccionar el tip adecuado para la pipeta

Las micropipetas requieren del uso de tips descartables estériles que son accesorios de plástico, ajustables, que recogen el líquido a dispensar. Cada micropipeta requiere un tipo de tip específico, que depende del volumen nominal de la pipeta y del modelo y marca del fabricante.

**NOTA:** las micropipetas se pueden identificar por colores y etiquetadas con el volumen para el que están diseñadas. La identificación por colores permite una identificación rápida de las puntas que vamos a necesitar.

**NOTA:** la elección del tip también depende del diseño del fabricante, hay tips universales que pueden ajustarse a los diferentes modelos o podemos encontrar tips con diseños especiales para adaptarse a necesidades concretas como puntas más finas y largas, tips con filtros, tips diseñados para aplicaciones específicas, etc.

## iv) Aspirar el líquido

Mantener la pipeta vertical y presionar el émbolo para llevar a cabo una correcta aspiración del líquido. Manteniendo esta posición, deberemos presionar el émbolo o pistón con el pulgar hasta el primer tope antes de introducirlo en el líquido.

**NOTA:** se recomienda tomar y dispensar el líquido 2-3 veces antes de aspirar el volumen definitivo. Esta acción favorece la formación de un film de líquido en la punta, lo que mejora la precisión del pipeteo, especialmente de líquidos volátiles o con densidad superior a la del agua. Acondicionar el interior de la punta de esta forma permite también neutralizar el efecto capilar que se produce en las puntas de volumen muy pequeño y equilibrar la temperatura de la punta y de la muestra cuando se usan puntas de volúmenes mayores. Esta práctica no es recomendable al pipetejar líquidos por encima de 37°C o líquidos muy fríos.

## v) Dispensar el líquido

La mejor técnica para dispensar el líquido es dejarlo caer por la pared lateral del recipiente donde queremos llevar la alícuota, presionaremos el pistón lentamente hasta llegar al segundo tope.

## vi) Expulsar y desechar la punta utilizada

Las micropipetas disponen de un botón eyector que nos permite expulsar los tips de manera automática, facilitando su reemplazo y reduciendo el riesgo de contaminaciones.

Siempre debemos depositar los tips utilizados en un contenedor destinado para ello, según las características de los materiales o reactivos con los que estemos trabajando.

**NOTA:** una buena gestión de los residuos o material desecharido en el laboratorio es esencial para nuestra seguridad en el trabajo y para el medioambiente.

- **Calibración y verificación externa:** la calibración incluye la determinación de

error absoluto y precisión (volumen mínimo, medio y máximo). Las pipetas automáticas deben ser calibradas por un laboratorio externo antes de su uso. Luego de la calibración se realiza la lectura de los datos obtenidos para verificar que sean correctos. Por ejemplo, si utilizamos una pipeta de 10  $\mu\text{l}$  durante un ensayo, con un error máximo permitido  $\pm 0,5 \mu\text{l}$ , la tolerancia sería de 9,5 a 10,5. Si el resultado es de 10,6  $\mu\text{l}$ , esta pipeta debe considerarse inadecuada para este uso y destinada a otra con mayor tolerancia.



Figura 16. Calibración de micropipetas

El período se define de acuerdo con las condiciones, historial del instrumento y resultados obtenidos luego de la calibración externa o luego de reparaciones críticas.

- **Recomendaciones para el mantenimiento preventivo:** inspección de piezas mecánicas, verificación de recorrido y lubricación del émbolo. Se recomienda de manera semestral o anual de acuerdo con el uso.

## C.5 DISPENSADORES

El dispensador es un instrumento que tiene como propósito traspasar volúmenes de un recipiente a otro (usarlo como pipeta), siempre y cuando no se requiera mayor exactitud al momento de la medición de volúmenes.



Figura 17. Dispensadores.

También se utiliza para añadir un volumen determinado de un reactivo o de un diluyente a una solución. Existen dos tipos de dispensadores:

- ✓ **Dispensador mecánico:** se necesita graduar manualmente, la medición de volumen tiene un porcentaje de error mayor que los eléctricos.
- ✓ **Dispensador electrónico:** cuenta con una pantalla LCD que hace más preciso la medición de volumen.

**- Ventajas de utilizar un dispensador:**

- ✓ Tiene un ajuste del volumen rápido, simple y preciso (algunos modelos cuentan con una pantalla LCD).
- ✓ Se puede calibrar las veces que sea necesario.
- ✓ Tiene una gran resistencia a los ácidos y a los cambios bruscos de temperatura.
- ✓ Los líquidos no se cristalizan.
- ✓ Es fácilmente desmontable.
- ✓ Tiene un error de medición de volumen alrededor de 0,5%.

**- Calibración y verificación externa:** la calibración incluye la determinación de error absoluto y precisión (volumen mínimo, medio y máximo o según el que se utiliza en el laboratorio diariamente). Los dispensadores se calibran por un laboratorio externo antes de su uso. Al igual que cualquier calibración, se realiza la lectura de los datos obtenidos para verificar que sean correctos.

**- Limpieza de pipetas y dispensadores:** todos los días de trabajo se debe verificar que el instrumento se encuentre limpio en sus superficies interiores y exteriores. Si se detecta suciedad, la misma debe limpiarse utilizando un solvente adecuado o una solución jabonosa. Revisar las recomendaciones del fabricante sobre la compatibilidad que tienen los materiales con que está fabricada la pipeta para seleccionar aquellos solventes que no produzcan efectos dañinos a la integridad de los componentes.

**NOTA:** algunas pipetas y dispensadores se pueden esterilizar en autoclave, utilizando un ciclo de 121°C y 30 min. Algunas requieren ser desensambladas para que el vapor esté en contacto con sus componentes internos. Para desensamblar se debe seguir los procedimientos indicados por los fabricantes.

## C.6 MEDIDORES DE pH

Los medidores de pH potenciométricos miden el voltaje entre dos electrodos y muestran el resultado convertido en el valor de pH correspondiente. Se compone de un simple amplificador electrónico y un par de electrodos, o alternativamente un electrodo de combinación, y algún tipo de pantalla calibrada en unidades de pH. Por lo general, tiene un electrodo de vidrio y un electrodo de referencia, o un electrodo de combinación. Los electrodos, o sondas, se insertan en la solución a ensayar.

El diseño de los electrodos es la parte clave. Se trata de estructuras de varilla, normalmente hechas de vidrio, con una bombilla que contiene el sensor en la parte inferior. El electrodo de vidrio para medir el pH tiene una bombilla de vidrio diseñada específicamente para ser selectiva a la concentración de iones de hidrógeno. En inmersión en la solución a ensayar, los iones hidrógeno en la solución de ensayo cambian por otros iones cargados positivamente en el bulbo de vidrio, creando un potencial electroquímico a través del bulbo. El amplificador electrónico detecta la diferencia de potencial eléctrico entre los dos electrodos generados en la medición y convierte la diferencia de potencial en unidades de pH.

Se verifican diariamente con buffer certificados 4 y 7. Se recomienda ajustar el instrumento una vez al día, antes de realizar la primera medición. A su vez, el instrumento se ajusta:

- ✓ Cuando el electrodo o el termómetro es reemplazado.

- ✓ Despues de efectuar determinaciones de pH de productos químicos agresivos.
- ✓ Cuando la frecuencia de uso es alta.

**NOTA:** Se cambia un electrodo por rotura, desperfecto o envejecimiento.

**- Verificación del ajuste de medidores de pH:** se recomienda que, como mínimo, una vez al mes se efectúa una verificación intermedia del estado de ajuste de los medidores de pH utilizados en el laboratorio. La verificación se efectúa utilizando una solución buffer de pH 6,01 denominada “de referencia” designada especialmente para este fin. Dicha solución no se utiliza para los ajustes diarios de los equipos. Una vez que los medidores de pH se encuentran ajustados se sumergen sus electrodos en la solución de referencia y efectúa nuevamente la lectura. Se tolera un desvío de  $\pm 0,03$  unidades de pH entre el valor de pH de la solución de referencia y el pH registrado por cada instrumento. En caso de que la verificación intermedia no resulte satisfactoria, se repite el ajuste y se efectúa una nueva verificación. Si la misma resulta nuevamente insatisfactoria se da de baja el equipo y se consulta al servicio para su arreglo.

**- Verificación de la sensibilidad y cambios de electrodo:** al tomar una medida de pH, luego de la etapa de ajuste, el pH debe llegar al equilibrio luego de 30 segundos y mantenerse estable, considerando estable la medida si en 5 segundos no hay cambios mayores que 0,02 unidades de pH. Tiempos mayores al establecido pueden deberse a un envejecimiento del electrodo, este proceso es especialmente acelerado cuando se utiliza el medidor de pH con medios de cultivo. La sensibilidad del electrodo se controla midiendo la diferencia de potencial en mV, entre pH=4 y pH=7, dicha diferencia debe ser 171-172 mV. Si la diferencia es inferior a 172 mV pero mayor de

150 mV se debe regenerar (reestablecer el electrodo) según las instrucciones del fabricante. Si la diferencia es menor de 150 mV se reemplaza el electrodo.

También puede verificarse aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Pendiente \%} = (\text{mV a pH 7} - \text{mV a pH 4}) \times \frac{100}{177}$$

Si el porcentaje es inferior a 95% o superior a 105% debe efectuarse un mantenimiento sobre el par (electrodo/ medidor de pH). Se verifica la sensibilidad de los electrodos por lo menos una vez al mes. Si existe coincidencia entre la indicación del instrumento y el valor asignado al material de referencia, el instrumento se considera en correcto estado de funcionamiento. Si existe discrepancia (por ejemplo  $>0,1$  U pH), el instrumento se coloca fuera de servicio.

**NOTA:** la medida de pH, en algunos medidores de pH se considera luego de 3 segundos de estabilidad. En otros casos los equipos traen un reloj que indica el momento de tomar la medida.

## C.7 TEMPORIZADORES

Los temporizadores tienen un contador en su interior, el cual se encarga de medir los segundos/min y poseen una alarma que se enciende cuando se cumple con el tiempo programado.

Es una pieza vital en los laboratorios para el control del tiempo, en procesos que requieren un tiempo determinado como puede ser la colocación en los bloques para la desnaturalización del ADN en la reacción de la cadena de polimerasa.

Se usa en los espacios de laboratorio, para programar el tiempo en que se tardará una reacción en aparecer, lo cual al cumplirse el tiempo se encenderá una alarma que le dirá al personal de laboratorio,

que ya se cumplió el tiempo de espera para un ensayo.

## D. MATERIALES

Conjunto de utensilios de los que precisa un laboratorio para poder llevar a cabo las técnicas analíticas. El material que indicamos a continuación es el que se utiliza en un laboratorio básico de microbiología. El material de laboratorio puede catalogarse en función de su naturaleza: vidrio, plástico y metal.

**Vidrio:** se caracteriza por resistir altas tem-

peraturas, aunque pueden ser deteriorados por productos químicos y altas temperaturas.

**Plástico:** tiene la ventaja de ser irrompible y tener poco peso. Algunos plásticos pueden contener líquidos hasta 130°C, pero no resisten la llama directa y pueden ser deteriorados por disolventes orgánicos y ácidos fuertes.

**Metal:** suele utilizarse como soporte o sujetión y recoger sólidos; como ejemplos tenemos las cucharillas o espátulas de metal.

**Tabla 15.** Ejemplo de materiales y cantidades necesarias para un laboratorio de microbiología de una planta frigorífica bovina.

MATERIALES	CANTIDAD ESTIMADA NECESARIA
Frascos Schott	10
Probeta	1
Gradilla	3
Ansas anillo y recta	2
Embudo	1
Vaso de precipitado	2
Pinza	Según la cantidad de técnicos
Cuchara	Según la cantidad de técnicos
Hoja de bisturi	De acuerdo con el análisis de muestras (caja 100 unidades)
Mango de bisturí	Según la cantidad de técnicos
Placas de Petri	Según la cantidad de ensayos
Tubos de ensayo	100
Espátula	Según la cantidad de técnicos

### D.1 MECHERO BUNSEN (CON VÁLVULA DE SEGURIDAD)

El mechero Bunsen es un instrumento utilizado para calentar muestras y sustancias químicas. Está constituido por un tubo vertical que va enroscado a un pie metálico con ingreso para el flujo de gas, el cual se regula a través de una llave sobre la mesa de trabajo. En la parte inferior del tubo vertical existen orificios y un anillo metálico móvil o collarín también horadado. Ajustando la posición relativa de estos

orificios (cuerpo del tubo y collarín respectivamente), los cuales pueden ser esféricos o rectangulares, se logra regular el flujo de aire que aporta el oxígeno necesario para llevar a cabo la combustión con formación de llama en la boca o parte superior del tubo vertical.



Figura 18. Mechero Bunsen.

Es importante entender las zonas de reacción de la llama:

- Base de la llama: De temperatura baja. Se emplea para investigar la presencia de sustancias volátiles que pueden colorear la llama.
- Zona de fusión: Se utiliza para investigar la fusibilidad y volatilidad.
- Zona oxidante inferior: se emplea para la oxidación de sustancias disueltas en flujo vítreo.
- Zona reductora inferior: Es utilizada para realizar reducciones sobre carbón vegetal o con flujo vítreo.
- Llama reductora superior: es la punta luminescente del cono interior de la llama. Se produce reduciendo el acceso de aire. Permite reducir óxidos en forma de incrustaciones.
- Llama oxidante superior: Es la zona no luminescente de la llama. Actúa mejor cuando los orificios de entrada del aire están abiertos. Se emplea en pruebas de oxidación, para desprender productos volátiles y para procesos de oxidación que no necesitan temperaturas excesivamente elevadas.

Las pruebas de fusibilidad permiten determinar a qué temperatura se funden algunas sustancias. Para determinar las diferentes temperaturas de la llama se analiza la luz emitida por un alambre de platino al entrar en contacto con la llama.

- Rojo incipiente 525°C.
- Rojo oscuro 700°C.
- Rojo cereza 950°C.
- Rojo amarillento 1100°C.
- Rojo blanco débil 1300°C.
- Rojo blanco brillante 1500°C.

**NOTA:** verificar el correcto el suministro de gas. Siempre debe ser manipulado por una única persona. La cerilla debe estar encendida antes de abrir la llave que suministra gas.

## D.2 PROBETA

Es un tubo transparente, el cual cuenta con una base que permite apoyar-

lo, y tiene como principal función medir el volumen de un líquido o de un sólido. Es una de las piezas de material fundamental en cualquier laboratorio. La probeta debe limpiarse antes de utilizar. Se añade líquido hasta un punto específico llamado menisco, que es la curva que se forma en la superficie del líquido al entrar en contacto con las paredes de la probeta, este procedimiento se conoce como enrasamiento.



Figura 19. Probeta.

## D.3 TUBO DE ENSAYO

Es un instrumento que se utiliza para verter líquidos, soluciones o muestras que se deben analizar. Posee una forma cilíndrica alargada generalmente de vidrio. Su base tiene forma de "U" redondeada.

El tubo de ensayo tiende a ser más pequeño que la probeta promedio, y es más fácil de transportar y almacenar.

## D.4 GRADILLA

Cuando utilizamos tubos de ensayo es necesario ser capaces de dejarlos en un sitio fijo desde el cual poder trabajar. Es por ello que una rejilla o gradilla puede ser de gran utilidad para depositarlos, especialmente cuando contamos con varias muestras. Las gradillas pueden adoptar diferentes formas y tamaños dependiendo de la cantidad de tubos que contengan y de los criterios utilizados para clasificarlos en varias categorías.

## D.5 PLACAS DE PETRI

Recipientes redondos, transparentes y con tapa, que se emplea habitualmente para colocar medios de cultivo sólidos para desarrollos bacterianos. Estos pueden de-

ser de vidro o de plástico, recomendando estos últimos por el fácil uso cotidiano.



Figura 20. Placa de Petri.

Es utilizado para poder observar diferentes tipos de muestras tanto biológicas como químicas. Las cuales se encuentran encerradas dentro de la placa. En caso de adquirir las de vidrio son reutilizables, se esterilizan mediante autoclave; las de plásticos son estériles y de diferentes tamaños según lo que se requiera, de diámetros 60 mm, 90 mm, 150 mm y 65 mm reticulada.

## D.6 UTENSILIOS

- Pinzas: son muy necesarias en un laboratorio, generalmente con el fin de sujetar algún instrumento concreto o mover algunos elementos de las muestras que estemos analizando. Existe una amplia variedad de pinzas dependiendo de si se prioriza la fuerza de agarre o la precisión.
- Bisturí: puede ser necesario hacer cortes precisos para alcanzar o separar una muestra de la materia a analizar.
- Espátula: con una apariencia similar a la de un cuchillo redondo, se trata de un instrumento útil de cara a recoger pequeños sólidos en forma de polvo.
- Cucharilla: es también un instrumento de utilidad en un laboratorio, especialmente si estamos realizando algún tipo de solución que requiera del uso de algún elemento químico en polvo.
- Ansa: elemento utilizado en el cultivo de microorganismos para trasvasar un inóculo. El material con el que se fabrican es generalmente de níquel y cromo o platino, y de plástico, estas últimas son descartables. Existen varios tipos, cada una con

una función, la elección dependerá de lo que se quiere realizar.

Ansa anillo sirve para tomar un inóculo de una suspensión microbiana (medio líquido) o una porción de colonia (medio sólido), para ser sembrado en otro medio de cultivo, también es útil para realizar extendidos microbianos sobre un portaobjeto; Ansa recta se usa para inocular ciertas pruebas bioquímicas, especialmente aquellas que requieren ser sembradas por la técnica de punción en medios semisólidos tales como medio SIM (destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno por los microorganismos).

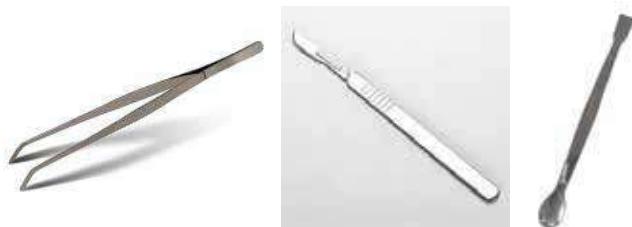


Figura 21. Pinzas, bisturí y cuchara.

## D.7 EMBUDO

Su principal función es trasvasar líquidos de un recipiente a otro evitando derrames. Son diseñados para ser utilizados en un entorno de laboratorio. Pueden ser de plástico o vidrio y tener un vástago corto o uno largo, hay varios tamaños que se pueden elegir según la cantidad de líquido que se necesita para atravesarlos rápidamente.

## D.8 VASO DE PRECIPITADO

Material no volumétrico utilizado para transportar líquidos a otros recipientes. Es un material de laboratorio que tiene forma cilíndrica, lo cual lo hace fácil de limpiar. Tiene las siguientes funciones:

- Contener sustancias en estado líquido o sólido.
- Mezclar sustancias líquidas.
- Calentar y enfriar líquidos contenidos en él.
- Obtener precipitados.



Figura 22. Vaso de precipitado.

### D.9 FRASCOS SCHOTT

Son frascos tapa a rosca y de vidrio borosilicato que se caracterizan por un coeficiente de dilatación muy bajo, una excelente resistencia a los cambios térmicos y a los agentes químicos. Cuentan con una escala de volumen graduada fácil de leer y un campo de marcado en esmalte blanco permanente. Soportan temperaturas de esterilización de 121 o 134°C. Volumen de 100 a 2000 ml.



Figura 23. Frascos Schott.

### D.10 BOLSAS ESTÉRILES

Las bolsas estériles para microbiología se usan para la homogeneización y el análisis de cualquier muestra sólida. Se recomiendan las bolsas de filtro porque la filtración de la muestra se realiza durante la homogeneización, por lo tanto es instantánea y estéril. Hay diferentes tipos:

- con filtro lateral: perfecto para muestras fibrosas;
- filtro de superficie total: perfecto para muestras pastosas;
- BagLight®, bolsa sin filtro bolsa para toma y homogeneización de muestras.



Figura 24. Bolsa de Stomacher.

### D.11 ESPONJAS

Las bolsas de muestreo con esponja son ideales para la toma de muestras. Estas bolsas están diseñadas para satisfacer las rigurosas necesidades de los análisis, tienen la resistencia adecuada para soportar el proceso de preparación de muestras. Las bolsas estériles para microbiología se usan para la homogeneización y el análisis de cualquier muestra.



Figura 25. Esponja.

Estas esponjas se pueden obtener deshidratadas o pre-hidratadas; para el caso de adquirirlas deshidratadas luego el laboratorio las hidrata con los ml necesarios del medio de cultivo que requiere utilizar para la metodología. Una vez hidratadas se recomienda conservarlas durante el tiempo recomendado por el fabricante del medio de cultivo que se utilizó para hidratarlas. Para las pre-hidratadas, el medio de cultivo ya se encuentra en la bolsa con esponja.

Las esponjas pre-hidratadas pueden contener un caldo neutralizante, Dey-Engley, o adquirirlo comercialmente para hidratarlas en el laboratorio, el cual tiene la función de neutralizar compuestos de

amonio cuaternario, limpiadores con alto contenido de ácido, desinfectantes a base de cloro y desinfectantes a base de peróxido de hidrógeno y ácido peroxyacético (PAA), importantes para la toma de muestras ambientales.

## D.12 HISOPOS

Los hisopos están diseñados para evaluar los procesos de saneamiento y permiten que se tomen medidas correctivas inmediatas en el control de higiene de superficies. Asegurar una buena recolección bacteriana de forma precisa y/o selectiva es la base que asegura la eficiencia del análisis posterior.

El hisopo de muestreo se puede usar húmedo o seco. Se presentan sin medio de transporte o con medio de transporte agar o líquido. Los hisopos que no poseen medio de transporte se adquieren embolsados de forma unitaria en formato peel-pack, pueden ser de madera o plástico y se complementa con una bolsa de muestreo estéril con diluyente Butterfield o agua de peptona tamponada. Los hisopados con medios de transporte, ya sea agar o líquido, se adquieren en un contenedor que posee la forma del hisopo.

## D.13 ESCOBILLA

La limpieza del material de laboratorio, tanto antes como después de utilizarlo, es algo fundamental que de hecho puede llegar a alterar en gran medida los resultados de la experimentación o análisis. Es por ello que una escobilla que permita por ejemplo limpiar matraces o tubos de ensayo es algo imprescindible.

## E. MEDIOS DE CULTIVO GENERALIDADES

Los medios de cultivo son utilizados en el laboratorio para el transporte, desarrollo o almacenamiento de microorganismos.

El medio de cultivo debe contener

todos los nutrientes que el microorganismo requiere para su crecimiento. Los microorganismos requieren de una fuente de energía, carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y varios minerales. Sin embargo, la composición precisa del medio de cultivo va a depender del Género y Especie que se deseé cultivar, y para ello es necesario conocer sus exigencias nutritivas y condiciones de cultivo (temperatura, pH, humedad, salinidad, atmósfera, luz ambiental y consistencia del medio, entre otras variables).

## CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

✓ Según la consistencia, los medios de cultivo se clasifican en medios líquidos, sólidos o semisólidos. Si se necesita un medio sólido, se logra adicionando 1 a 2% de agar al medio de cultivo líquido. Los medios semisólidos incluyen agar al 0,3%. El agar se funde durante el proceso de esterilización, una vez fundido y templado, se vierte en placas de Petri hasta su solidificación. Los medios sólidos inmovilizan las células, permitiéndoles crecer y formar masas aisladas y visibles llamadas colonias.

✓ Por su función se clasifican en:

- **Medio de transporte** no es un medio de cultivo en sí, sino que permite el mantenimiento de las muestras hasta su procesamiento en el laboratorio, un ejemplo son los medios utilizados con los hisopos para la toma de muestras ambientales. No tienen nutrientes sino agua, sales y un amortiguador de pH.

- **Medio de enriquecimiento** favorecen la multiplicación de la mayoría de los microorganismos que no tienen requerimientos nutricionales demasiado exigentes. Por ejemplo, caldo tripticasa de soja o agua peptonada.

- **Medio enriquecido** se les puede adicionar nutrientes especiales para alentar el crecimiento de microorganismos exigentes.

- **Medios selectivos** favorecen la multiplicación de un determinado microorganismo o grupo de microorganismos. Por ejemplo, el agregado de antibióticos favorece el crecimiento de algunos microorganismos por sobre la flora acompañante.

- **Medios diferenciales** permiten discriminar entre diferentes grupos de microorganismos basándose en las características biológicas (metabólicas generalmente) particulares de cada uno.

Algunos medios pueden presentar más de una función al mismo tiempo, por ejemplo pueden ser de **enriquecimiento y diferenciales**, como el agar sangre que permite el crecimiento de microorganismos exigentes y al mismo tiempo permite distinguir entre aquellos que son hemolíticos de los que no lo son. Otros medios pueden ser **selectivos y diferenciales** al mismo tiempo, como por ejemplo el agar MacConkey ya que tiene sales biliares (agente selectivo), que inhiben el crecimiento de bacterias gram-positivas; y además contiene lactosa y rojo neutro como indicador de pH (agentes diferenciales). Aquellas bacterias que son capaces de fermentar la lactosa, y acidificar el medio de cultivo (ácidos producto de la fermentación) se ven de color rosa-rojo por el indicador de pH rojo neutro (que se mantiene en un color rojo-rosado en acidez-neutralidad y vira a amarillo a pH básico). En este medio las bacterias no fermentadoras de lactosa se ven incoloras.

## PREPARACIÓN, ACONDICIONAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

En los laboratorios de planta frigorífica es recomendable la utilización de métodos rápidos. Sin embargo, podría ser necesario elaborar medios de cultivo. A

continuación, se presenta una serie de pasos para su preparación:

- a. **Partir de un frasco de medio de cultivo comercial (deshidratado).**
- b. **Pesar** la cantidad indicada por el fabricante en una balanza de precisión. Considerar el volumen de medio necesario para el análisis a realizar.
- c. **Disolver** los componentes del medio en agua destilada. Utilizar una probeta para medir el volumen de agua destilada adecuada e incorporar al volumen de medio de cultivo pesado. Si el medio contiene un agente solidificante (agar) es necesario calentar el preparado hasta su ebullición para asegurar una completa disolución del agar (medios sólidos y semisólidos). Para medios líquidos no es necesario calentar. En este caso se debe agitar la mezcla hasta su completa disolución.
- d. Según la forma en que vaya a utilizarse el medio, el procedimiento a seguir será diferente:

- **Medios líquidos:** una vez disueltos los componentes, repartir el volumen necesario en el recipiente adecuado, dependiendo del uso posterior del mismo, ya sea Erlenmeyer, tubos, frascos de vidrio, etc. Tapar con tapón de algodón y aluminio, o tapa plástica, o metálica (resistentes a la temperatura de esterilización) y llevar a esterilizar en autoclave.

- **Medios sólidos:** una vez disueltos los componentes, repartir el volumen necesario en el recipiente adecuado, dependiendo del uso posterior del mismo (Erlenmeyer, tubos, frascos de vidrio). Tapar el recipiente como se mencionó anteriormente y llevar a esterilizar en autoclave.

- e. **Esterilizar** el medio de cultivo para evitar el crecimiento de contaminantes. Para la mayoría de los medios de cultivo esta etapa se realiza mediante calor húmedo en autoclave (10-15 min a 121°C).

- f. **Acondicionar el medio estéril**, en el caso de medios sólidos contenidos en tubos deberán inclinarse para que al solidificarse adopten la forma de agar inclinado o pico de flauta si esa es su finalidad. Las placas de Petri se preparan vertiendo el medio fundido y estéril dentro de ellas y en un ambiente aséptico (por ejemplo en la proximidad de la llama de un mechero Bunsen, CSB o flujo laminar). Es conveniente homogeneizar el medio en el transcurso de la operación para evitar que el agar sediente en el fondo del recipiente y no se distribuya por igual en todas las placas. También es posible conservar el medio destinado a preparar placas de Petri solidificado y estéril en frascos que se fundirán en baño termostático en el momento de la preparación de estas.
- g. **Conservar** a temperatura de laboratorio por un período máximo de 1 semana protegidos de la luz. Sin embargo, almacenados bajo refrigeración (2-8°C) se prolonga la vida útil ya que reduce su posible contaminación, deshidratación y el consiguiente cambio en la concentración de sus componentes.

# CAPÍTULO V

## CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS, PLANES DE MUESTREO Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

*Magdalena Hortel<sup>1</sup>, Juan Cruz Chiarizia<sup>1</sup>,  
Sergio Epszteyn<sup>2</sup> y David Teitelbaum<sup>3</sup>*

1. Laboratorio Compañía Bernal S.A. Laboratorio del establecimiento frigorífico 2062. Bernal Oeste, Argentina.
2. Laboratorio de Investigación y Monitoreo. Dirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
3. Minerva Foods, Argentina.

En este capítulo abordaremos conceptos básicos sobre criterios microbiológicos y planes de muestreo, para luego aplicarlos a la industria frigorífica bovina. Se considerarán los siguientes componentes:

- A. Criterio microbiológico.
- B. Planes de muestreo.
- C. Metodología analítica.
- D. Gestión de resultados.
- E. Muestreo en frigoríficos bovinos.

## A. CRITERIO MICROBIOLOGICO

El criterio microbiológico es una **convención o acuerdo** establecido por una empresa, entre empresas o por organismos oficiales (regionales, nacionales o internacionales) con el objetivo de establecer de forma objetiva la aptitud de determinado producto alimenticio o sus materias primas.

El criterio microbiológico constituye una herramienta que permite aceptar o rechazar la materia prima o el alimento elaborado.

Según el nivel de organismo o entidad que los adopte, los criterios microbiológicos pueden clasificarse en:

### ✓ Normas o estándares.

- Código Alimentario Argentino (CAA). Capítulo VI.
- Reglamento Sanitario de los Alimentos (República de Chile).
- Normativa N° 161 (República Federativa de Brasil).
- Norma Nacional GB/T (República Popular China).
- Government of Canadá.
- Requerimiento 170419 (Israel).
- FSIS Directive 10010.1 Rev 5 (USA).
- Reglamento (CE) N° 2073/2005 (Unión Europea).
- SanPin 2.3.2. 1078-01 (Federación de Rusia)

### ✓ Especificaciones.

Son documentos que describen detalladamente la calidad microbiológica de un alimento. Se los usa como requerimiento de compra referido a un ingrediente, materia prima o producto final. Las especificaciones son muy utilizadas en transacciones comerciales nacionales e internacionales y tienen valor contractual. Los criterios microbiológicos deben ajustarse al producto y a la fase de la cadena alimentaria a la que se aplicarán.

### ✓ Directrices.

Se emplean en la industria para monitorear un proceso de producción. Funcionan como mecanismo de alerta para identificar condiciones microbiológicas en distintos puntos del proceso o en el producto final. Se utilizan para verificar la eficacia del proceso y la conformidad de las BPM.

En la industria frigorífica bovina se pueden aplicar para:

- **Aceptación de materias primas:** por ejemplo análisis de cortes y recortes de carne de elaboración propia o de terceros para elaboración de hamburguesas. Es posible que resulten más rigurosos que los criterios aplicados con fines reglamentarios.
- **Verificación de procesos en producto intermedio:** por ejemplo análisis de medias reses en cámara de maduración o de productos crudos que luego se comercializan termoprocesados.
- **Verificación y liberación de producto terminado:** por ejemplo análisis de hamburguesas, cortes envasados al vacío y menudencias en su envase primario, entre otros.

**Los criterios microbiológicos se definen por las siguientes variables:**

- Ausencia/presencia o cantidad de microorganismos y/o de sus toxinas/metabolitos por unidad de masa, volumen o superficies.

- Tipo o grupo de microorganismos: su presencia puede ser beneficiosa, neutral o perjudicial para el producto como para la población que lo va a consumir.
- Riesgo potencial de causar enfermedad en los consumidores.
- Tipo de población que va a consumir el producto.
- Capacidad de producir alteraciones que afecten la vida útil del producto.
- Propiedades intrínsecas y extrínsecas del alimento: serán determinantes de las posibilidades de crecimiento del microorganismo.
- Manipulación o proceso al que será sometido el alimento antes de ser consumido, y a la influencia de estos procedimientos sobre el posible crecimiento o producción de toxinas/metabolitos por parte del microorganismo.

De acuerdo con lo establecido en el capítulo XXI del CAA, los alimentos pueden clasificarse en 3 categorías, según el riesgo que representan para la salud de la población:

- **ALIMENTOS CLASE I:** destinados a poblaciones de riesgo. En caso de detectarse defectos podrían representar un riesgo grave para la salud de los consumidores, con evidencias documentadas de muerte o consecuencias adversas severas en la salud.
- **ALIMENTOS CLASE II:** existe una probabilidad de contaminación con consecuencias adversas temporarias o reversibles en la salud de los consumidores.
- **ALIMENTOS CLASE III:** no representan un riesgo para la salud de los consumidores, pero un defecto podría constituir una infracción.

Como surge de lo anterior, los criterios microbiológicos deben estar fundamentados en riesgos objetivos. Para la industria cárnica esta es una situación relevante, si ponemos como ejemplo el riesgo de síndrome urémico hemolítico asociado al consumo de carne picada, hamburguesa y

cortes de carne, el nivel de exigencia del criterio microbiológico será mayor en la medida que aumente el riesgo del producto (carne picada: mayor riesgo).

Según los principios y directrices para el establecimiento y la aplicación de criterios microbiológicos relativos a los alimentos (Codex CAC/GL 21-1997), un criterio microbiológico debe:

- ser apropiado para proteger la salud del consumidor y también para asegurar prácticas equitativas en el comercio de los alimentos.
- ser práctico, posible y establecido sólo cuando sea necesario.
- estar claramente articulado.
- estar basado en la información científica.
- seguir un enfoque estructurado y transparente.
- ser establecido en base al conocimiento de los microorganismos y su presencia y comportamiento a lo largo de la cadena alimentaria.
- considerar el uso previsto y el uso real del producto final por parte de los consumidores.
- ser revisado periódicamente para asegurar que continúan siendo relevantes para el propósito establecido y bajo las condiciones y prácticas actuales.

**NOTA:** se recomienda complementar la información de este capítulo con:

- Directrices Generales sobre muestreo (Codex CAC/GL 50-2004).
- Principios y directrices para la aplicación de la gestión de riesgos microbiológicos (Codex CAC/GL 63-2007).
- Evaluación de riesgos microbiológicos en alimentos guía para implementación en los países. Organización Panamericana de la Salud 2021.

## B. PLANES DE MUESTREO

Los planes de muestreo se utilizan para el análisis de lotes de producción. Son instrumentos estadísticos que se definen y utilizan para determinar la cantidad de unidades defectuosas en el lote mediante el análisis de una porción representativa del mismo.

El plan de muestreo es un componente fundamental del criterio microbiológico, y su definición, junto con el tamaño de la muestra determinan la **cantidad de muestra** que se debe tomar para determinar si el producto cumple o no con el criterio microbiológico establecido.

De forma general, los planes de muestreo se dividen en dos grandes grupos:

- **Planes de muestreo por variables:** se utilizan para analizar aceptabilidad de lotes según parámetros cuya distribución es continua (peso, pH, longitud). Se analiza la curva de dispersión de los parámetros que se miden. Con las mediciones es posible hacer un cálculo estadístico que se encuentra en función de la media y el desvío estándar. El lote del producto se rechaza o se acepta dependiendo del valor.
- **Planes de muestreo de atributos:** se utilizan para el análisis de variables discretas, como número de microorganismos. Especialmente útiles para los casos en los que el análisis es de naturaleza destructiva y no se puede volver a utilizar la muestra analizada, como es el caso del análisis microbiológico.

En este tipo de planes, se establece un valor límite **M** a partir del cual se considera que el resultado del análisis de la unidad muestral es defectuoso cuando el resultado supera ese valor.

Se extrae de forma aleatoria un determinado número de muestras **N** del lote a

analizar y se las clasifica de acuerdo con sus características, en unidades aceptables o defectuosas.

El lote será aceptado cuando el número de unidades defectuosas **c** sea igual o menor que el límite de tolerancia establecido.

El lote será rechazado cuando el número de unidades defectuosas **c** supere el límite de tolerancia establecido.

Los Planes de muestreo por atributos, a su vez, se dividen en 2 grupos:

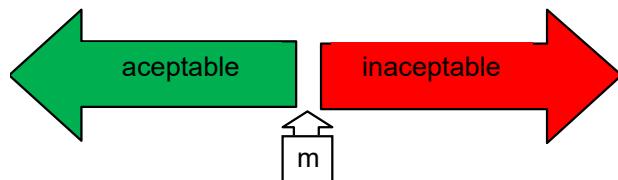
### Planes de muestreo de atributos de dos clases:

Se utilizan para análisis cualitativos y pueden tener dos resultados posibles:

- Negativo, ausencia (satisfactorio).
- Positivo, presencia (insatisfactorio).

También pueden aplicarse a análisis cuantitativos. Previamente se define un valor límite y tienen dos resultados posibles:

- El resultado no supera el valor límite: negativo, ausencia (satisfactorio).
- El resultado supera el valor límite: positivo, presencia (insatisfactorio).



Un plan de dos clases se encuentra definido por los siguientes valores:

**N** = número de unidades de muestreo a analizar.

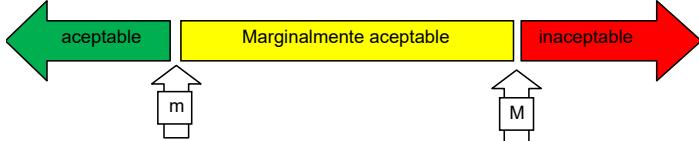
**c** = máxima cantidad de unidades de muestreo en las que se puede obtener un resultado insatisfactorio.

**m** = en un muestreo de dos clases delimita un resultado satisfactorio de uno insatisfactorio, en el caso de análisis de microorganismos patógenos, el valor es 0, ya que no se tolera su presencia en ninguna de las muestras analizadas (presencia/ausencia).

### Planes de muestreo de atributos de tres clases:

Se aplican a análisis cuantitativos, en los que se definen tres calidades del producto:

- aceptable (satisfactorio)
- marginalmente aceptable
- Inaceptable (insatisfactorio)



Un plan de tres clases se encuentra definido por los siguientes valores:

**n** = número de unidades de muestreo a analizar.

**M** = valor definido por un nivel de peligro o de una contaminación inaceptable. Recuentos superiores a este valor son inaceptables y si al menos en una unidad se obtiene un resultado superior a M el lote es rechazado.

**m** = valor definido por buenas prácticas. En un muestreo de tres clases delimita una calidad satisfactoria ( $\leq m$ ) de una marginalmente aceptable ( $>m$  y  $\leq M$ ).

**c** = máxima cantidad de unidades de muestreo en las que se puede obtener un resultado en el rango de calidad marginalmente aceptable. Cuando se encuentra un valor superior a c se rechaza el lote.

### **Elección de un plan de muestreo**

La elección de un plan de muestreo se establece en función del riesgo objetivo y en base a la peligrosidad del microorganismo, al tipo de alimento y a la manipulación que puede neutralizar, aumentar o no influir sobre el riesgo en cuestión.

La ICMSF (2011) propone que, para la elección de los microorganismos a analizar se debe tener en cuenta el tipo de producto, su historial como productor de enfermedades transmitidas por alimentos (en el caso de patógenos), la determinación de la vida útil, entre otros, y sugiere además utilizar la clasificación de microorganismos de acuerdo con la tabla 16:

**Tabla 16.** Clasificación de la ICMSF (2011) de los microorganismos según niveles de peligro para la salud, descripción y ejemplos.

Nivel de peligro para la salud	Descripción	Ejemplos
<b>Peligro severo</b>	Patógenos que presentan un alto peligro.	STEC TOP SEVEN (O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157), <i>C. botulinum</i> , <i>S. Typhi</i> , <i>S. Paratyphi</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>L. monocytogenes</i> para grupos de riesgo
<b>Peligro severo con diseminación potencial</b>	Patógenos con un menor peligro y posibilidad de producir enfermedades secundarias.	<i>E. coli</i> patógena, <i>Salmonella</i> no consideradas en el punto anterior, <i>L. monocytogenes</i>
<b>Peligro moderado con diseminación limitada</b>	Patógenos que producen enfermedades sin provocar en general infecciones secundarias.	<i>B. cereus</i> , <i>C. perfringens</i> A, <i>S. aureus</i>
<b>Peligro bajo, indirecto</b>	Microorganismos que se consideran indicadores de falta de higiene, pero no se puede establecer una relación entre su presencia y la de patógenos.	Coliformes, enterobacterias
<b>Sin peligro para la salud</b>	Microorganismos que pueden dar una idea de las condiciones de higiene durante el proceso o la vida útil del producto y que no están relacionados con un peligro para la salud.	Recuento de aerobios, lactobacilos
<b>Reducción del peligro</b>	Producto estará expuesto a una condición que reducirá el peligro.	STEC no-O157 (eae negativo) en carne cruda que será irradiada.
<b>Sin cambio en el peligro</b>	El producto no estará expuesto a condiciones en que los microorganismos se pueden multiplicar.	<i>Listeria monocytogenes</i> en salames con starters.
<b>El peligro puede incrementarse</b>	El producto está expuesto a la posibilidad de un incremento de los microorganismos.	<i>Escherichia coli</i> en carne envasada al vacío

A partir de la clasificación descripta en la tabla 16, la ICMSF sugiere una clasificación de planes de muestreo que comprende 15 casos, definidos por el tipo y seve-

ridad del peligro y por otra parte la manipulación que tendrá el producto luego del muestreo y cómo será consumido.

**Tabla 17.** Clasificación de planes de muestreo según nivel de peligro para la salud y las condiciones en las cuales el producto será manipulado y consumido luego del muestreo (ICMSF 8, 2011).

NIVEL DE PELIGRO PARA LA SALUD	CONDICIONES EN LAS CUALES EL PRODUCTO SERÁ MANIPULADO Y CONSUMIDO LUEGO DEL MUESTREO		
	Condiciones producen una reducción	Condiciones no producen un cambio	Condiciones puede incrementar
<b>Sin peligro directo para la salud</b>	Aumenta la vida útil	Sin cambio	Se reduce la vida útil
Contaminación general, vida útil, etc.	Caso 1 3 clases n=5, c=3	Caso 2 3 clases n=5, c=2	Caso 3 3 clases n=5, c=1
<b>Con peligro para la salud</b>	Reducción del peligro	Sin cambio en el peligro	El peligro se incrementa
Bajo, indirecto (indicadores)	Caso 4 3 clases n=5, c=3	Caso 5 3 clases n=5, c=2	Caso 6 3 clases n=5, c=1
Moderado, directo, diseminación limitada	Caso 7 3 clases n=5, c=2	Caso 8 3 clases n=5, c=1	Caso 9 3 clases n=10, c=1
Moderado, directo, diseminación potencial	Caso 10 2 clases n=5, c=0	Caso 11 2 clases n=10, c=0	Caso 12 2 clases n=20, c=0
Severo, directo	Caso 13 2 clases n=15, c=0	Caso 14 2 clases n=30, c=0	Caso 15 2 clases n=60, c=0

Todo plan de muestreo incluye un procedimiento y criterios decisorios que se aplican al lote, basándose en el examen del número prescrito de unidades de la muestra y de las unidades analíticas subsiguientes del tamaño indicado en los métodos determinados.

A los efectos de facilitar la comprensión y a modo de ejemplo, tomaremos el criterio microbiológico del artículo 255 del CAA definido para la carne picada. “La carne picada fresca deberá responder a las siguientes especificaciones microbiológicas”.

**NOTA:** un plan de muestreo adecuadamente diseñado define la probabilidad de detección de microorganismos en un lote, pero se debe tener presente que ningún plan de muestreo puede asegurar la ausencia de un determinado organismo. Los planes de muestreo deben ser administrativa y económicamente factibles.

**Tabla 18.** Criterios microbiológicos para carne picada (CAA) - Artículo 255 - (Resolución Conjunta SCS y SAByDR N° 30/2021)

Determinación	Criterio microbiológico	Método de Análisis
Recuento de bacterias aerobias mesófilas (UFC/g)	n=5, c=3, m= $10^6$ , M= $10^7$	ISO 4833-1 BAM-FDA
Recuento de <i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	n=5, c=2, m=100, M=500	ISO 16649-2 3
Recuento de <i>Staphylococcus coagulasa positivo</i> (UFC/g)	n=5, c=2, m= $10^2$ , M= $10^3$	ISO 6888-1
<i>Salmonella</i> spp.	n=5, c=0, ausencia en 25 g	ISO 6579-1 USDA-FSIS
<i>E. coli</i> O157:H7/NM	n=5, c=0, ausencia en 65 g	ISO 16654 USDA-FSIS
STEC no-O157	n=5, c=0, ausencia en 65 g	ISO 13136 USDA-FSIS

Como se observa en la tabla 18, existe un criterio microbiológico para cada uno de los microorganismos relevantes, (*Salmonella* spp., *E. coli*, *E. coli* O157:H7/NM) o grupo de microorganismos (Bacterias aerobias mesófilas, STEC no-O157) de acuerdo con las características del producto y a los antecedentes epidemiológicos vinculados con el consumo del producto.

El criterio microbiológico propiamente dicho (segunda columna de la tabla 18), está compuesto por 3 variables fundamentales:

1. **n** unidades muestrales del mismo lote, que deben ser tomadas para satisfacer el criterio.
2. **c** que indica el número de unidades muestrales que pueden estar dentro del intervalo de aceptación marginal.
3. **Tamaño de la muestra**, cuando se trata de microorganismos indicadores está expresado en las unidades de la primera columna como UFC/g, es decir que la muestra debe tener como mínimo 1 g,

o en el caso de microorganismos patógenos, variará de acuerdo con el riesgo que representa su presencia, motivo por el cual se exige su ausencia en 25 g, en 65 g o en el tamaño de muestra que se considere más adecuado.

Cuando el criterio está establecido para microorganismos patógenos como *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 o STEC no-O157, no se tolera su presencia en ninguna de las unidades muestrales analizadas. Si una muestra es positiva se rechaza el lote. Por lo tanto c=0.

Cuando el criterio está establecido para microorganismos indicadores (Bacterias aerobias mesófilas, *E. coli* genérico y *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo), se utilizan planes de muestreo de 3 clases.

En este caso el valor de **c** indica la cantidad máxima de muestras que pueden estar dentro del intervalo de aceptabilidad marginal como para que no se produzca el rechazo del producto.

**NOTA:** Se recomienda no interpretar ausencia de patógenos con base en resultados de recuentos de indicadores. El recuento de indicadores puede ser satisfactorio, aunque no significa que en el lote pueda encontrarse un patógeno. Para patógenos es necesario utilizar metodologías específicas.

En el ejemplo de la tabla 18, podemos ver los dos tipos de planes de muestreo, aplicados según el tipo de microorganismo.

Así, para microorganismos o grupos de microorganismos indicadores, observamos criterios con planes de muestreo de 3 clases, en los que se establece un número de unidades muestrales ( $n=5$ ). Para cumplir el criterio es necesario analizar 5 muestras, que además de ser representativas del lote, deben tener un tamaño mínimo que permita obtener un resultado que se expresa en UFC/g de muestra.

A diferencia del análisis para patógenos, el análisis de los microorganismos indicadores es cuantitativo, el resultado se expresa en UFC/g.

Como en cualquier plan de muestreo de 3 clases, en el criterio aparecen 3 valores: **m**, **M** y **c**.

Como se explicó, el valor **m** fija el límite de aceptabilidad del criterio. Todos los valores menores o iguales a **m** indican que la muestra analizada es aceptable según el criterio establecido.

Por ejemplo, para el análisis de *E. coli* en carne picada el criterio establecido es  $m=100$  (UFC/g). Entonces, si ninguna de las 5 muestras del lote analizado supera las 100 UFC/g, el lote cumple con este criterio.

El valor **M** fija el límite máximo de tolerancia. Si 1 de las 5 muestras analizadas

superá este valor se rechaza el lote. En el ejemplo de carne picada, si de las 5 muestras analizadas, 4 están por debajo del valor **m** pero hay una que supera el **M** ( $>500$  UFC/g) se rechaza el lote.

Estos serían los casos más extremos, pero puede ocurrir que en el análisis aparezcan resultados que están por arriba de **m** (100 UFC/g) pero por debajo de **M** (500 UFC/g).

En estos casos adquiere importancia lo que establece el valor **c**, que fija el número de unidades muestrales cuyo resultado cae dentro del intervalo de aceptabilidad marginal. En el ejemplo es **c=2**.

Esto implica que, si el número de unidades muestrales que presentan resultados marginalmente aceptables (están entre **m** y **M**, o entre 100 y 500 UFC/g) y es igual o menor que 2, se acepta lote.

Si la cantidad de muestras con resultados marginalmente aceptables es de 3 o mayor, se rechaza el lote.

## C. METODOLOGIA ANALITICA

Entre los componentes de un criterio microbiológico está la metodología a emplear para las determinaciones analíticas, lo que constituye una guía fundamental para el laboratorio.

Los métodos microbiológicos deben ser razonables en lo que refiere a complejidad, disponibilidad de medios y equipos, facilidad de interpretación, tiempo requerido y costo.

Asimismo, deben utilizarse métodos analíticos previamente validados para el producto a analizar, teniendo en cuenta su aptitud para detectar o cuantificar los microorganismos bajo análisis (límite de detección, capacidad de repetitividad, capacidad de reproducción, inclusividad y exclusividad).

Para el cumplimiento del criterio deben seguirse los pasos establecidos por la normativa metodológica oficial definida en el criterio microbiológico correspondiente.

Dichas metodologías forman parte de normas oficiales que se adoptan de forma universal o por lo menos, en grandes bloques regionales como la Unión Europea (Normas ISO), o por organismos dependientes del Ministerio de Salud (FDA) o del Ministerio de Agricultura (FSIS/USDA) de los USA, y que son utilizadas como metodologías de referencia en países como el nuestro.

## D. GESTION DE RESULTADOS

En las situaciones donde se detecta la no conformidad con un criterio microbiológico (resultados no satisfactorios) deben aplicarse acciones correctivas relativas al propósito del análisis. Estas acciones deben basarse en una evaluación del riesgo al consumidor, donde así corresponda. Las empresas de alimentos deben reevaluar sus sistemas de control de la inocuidad de los alimentos.

En caso de una no conformidad respecto del criterio microbiológico para un patógeno transmitido por los alimentos, las medidas correctivas deben incluir la eliminación o disposición apropiada del producto. Eso podría incluir: someterlo a otro proceso, destinarlo a un uso distinto, retiro del mercado y recuperación del producto, volver a procesarlo, rechazo o destrucción del producto y una investigación más profunda para determinar las medidas apropiadas a tomar. Otras medidas podrían incluir un muestreo más frecuente, inspección y auditorias, multas o hasta la suspensión oficial de las operaciones.

**NOTA:** el número y la magnitud de unidades analíticas examinadas por cada lote sometido a ensayo deben corresponder a lo establecido en el plan de muestreo y no debe modificarse. Un lote de producción de hamburguesas positivo a *E. coli* O157:H7 no se debe someter a repetidos análisis con el fin de lograr su conformidad.**NOTA:** el hallazgo de una bacteria patógena en un lote de producción refleja fallas en el proceso o materia prima contaminada que el proceso no pudo eliminar. Se debe realizar un análisis causa raíz para identificar y corregir el desvío.

## E. MUESTREO EN FRIGORIFICOS BOVINOS

### MUESTREOS OFICIALES

Los muestreos oficiales son efectuados y/o supervisados por personal del Servicio de Inspección Veterinaria (SIV) del Senasa y las muestras deben remitirse a laboratorios de la Red Nacional de Laboratorios, junto con la correspondiente "Solicitud de Análisis" (PG-07). La solicitud se completa on-line y los informes oficiales pueden ser entregados de forma digital.

En anexo 2 se presenta la normativa del Senasa (Circulares, Ordenes de Servicio y Memorandos) que incluye requisitos microbiológicos en el marco de muestreos oficiales según el destino del producto.

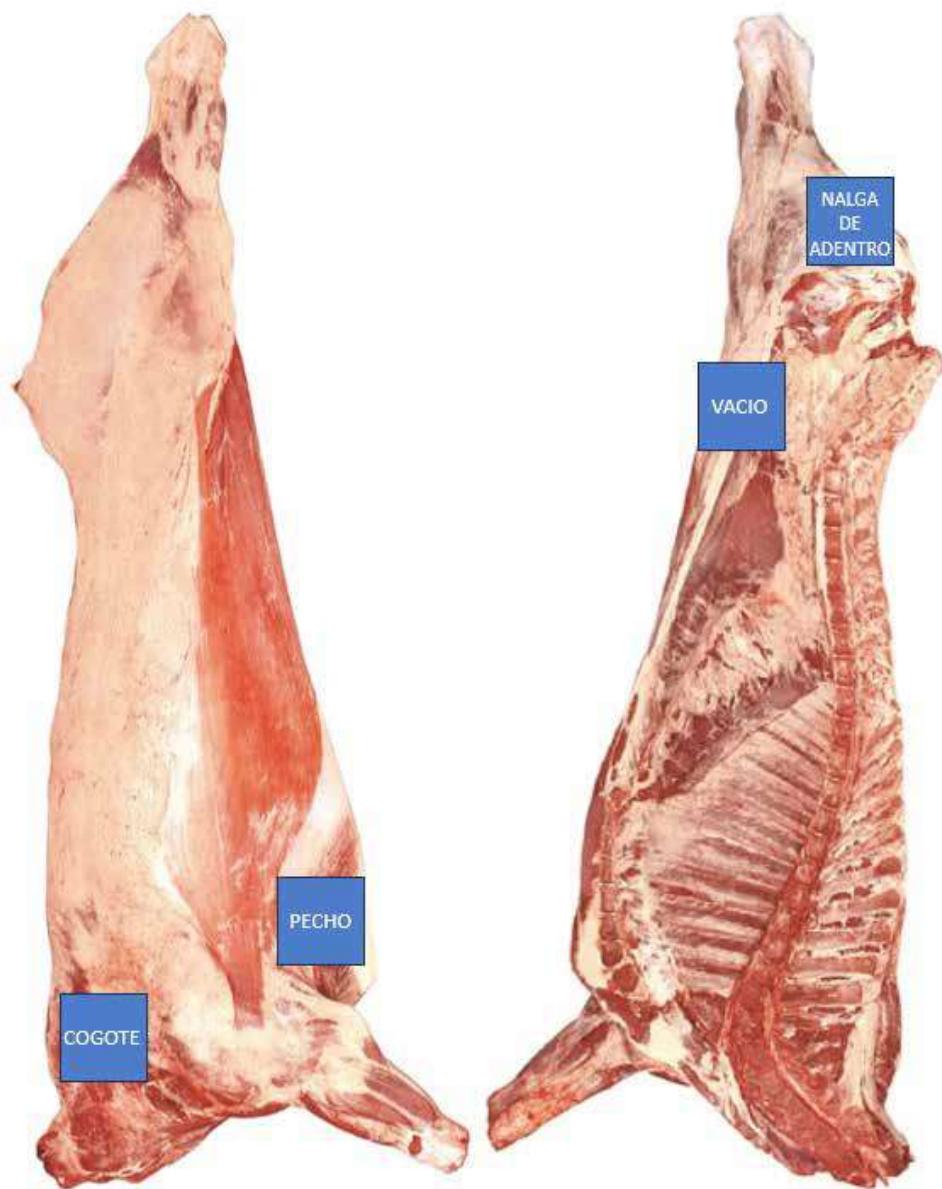


Figura 26. Zonas de muestreo en una media res.

ANEXO 2. Normativa del Senasa para análisis microbiológicos según destino y producto.

NORMATIVA	DESTINO	PRODUCTO	MICROORGANISMOS	MÉTODO DE MUESTREO	SUPERFICIE	CANTIDAD DE MUESTRAS	CRITERIO MICROBIOLÓGICO	FRECUENCIA	LABORATORIO DE ANÁLISIS
Circular Senasa 3259 Rev 3/2022	USA	Media res refrigerada (12 h en cámara)	<i>E. coli</i>	Esponjado	300 cm <sup>2</sup> (flanco, pecho, cuarto trasero) en ese orden 3 x 100 cm <sup>2</sup>	1 cada 300 reses	Rango Aceptable = promedio más un desvío estándar m = valores obtenidos entre el rango aceptable y M M = mayor al promedio más tres desvíos estándar n = 13 c = 3	1 prueba cada 300 reses con un mínimo de 1 muestra por semana de operación.	privado (puede ser del frigorífico)
				Destructivo	20 cm de largo x 15 cm de ancho y 10 cm de grosor (flanco, pecho, cuarto trasero)	1 cada 300 reses	n = 13 m = negativo M = > 100 UFC/cm <sup>2</sup> c = 3	1 prueba cada 300 reses con un mínimo de 1 muestra por semana de operación.	privado (puede ser del frigorífico)
Circular Senasa 4245 Rev 2/2022	USA	Media res después de 12 h o más de la faena	<i>Salmonella</i> spp.	Esponjado	300 cm <sup>2</sup> (flanco, pecho, cuarto trasero) En ese orden	82	ausencia n= 83 c=1	1 set de 82 muestras al año. Cumplido este requisito, el resto del año se tomarán muestras mensuales al azar (1 por mes)	RedLab Senasa
		Carne picada	<i>Salmonella</i> spp.	Luego del picado y antes de agregar especias y aditivos antes del empaque final	NC	53 Muestra de 325 g (5 submuestras de 65 g cada una)	ausencia n= 53 c=5	1 set de 53 muestras. Cumplido este requisito, el resto del año se tomarán muestras mensuales al azar (1 por mes)	RedILab Senasa
Circular Senasa 3834	Consumo interno	Media res	<i>E. coli</i>	Esponjado o hisopado en cámara de oreo o maduración	4 x 100 cm <sup>2</sup> = 400 cm <sup>2</sup> (cuadril, vacío, pecho y cogote)	1 muestra hasta 300 reses o 1 muestra cada 300 reses	aceptable <5 UFC cm <sup>2</sup> marginal 5 a 100 UFC/cm <sup>2</sup> inaceptable > 100 UFC/cm <sup>2</sup>	El primer mes se realizará todos los días. Si no se presentan desvíos se disminuye paulatinamente a 3 semanas el mes dos, dos semanas el mes tres y una semana por mes como base mínima siempre que se mantenga dentro de los parámetros establecidos. Uno a tres marginales en el mes y ningún inaceptable, requiere acciones correctivas pasando a la etapa siguiente. Mas de tres marginales o un inaceptable en el mes requiere acciones correctivas y se retorna a la etapa inicial (muestreo diario por 4 semanas).	Laboratorio propio o externo
		Media res	<i>E. coli</i> O157:H7	Esponjado o hisopado	4 x 100 cm <sup>2</sup> = 400 cm <sup>2</sup> (nalga, ijada, pecho y cogote)	1	ausencia	mensual	RedILab Senasa
				Destructivo	Trozo de superficie muscular de 10 x 10 cm. 4 x 100 cm <sup>2</sup> = 400 cm <sup>2</sup> (nalga, ijada, pecho y cogote)	1	ausencia	mensual	RedILab Senasa
		Recortes o trimming	<i>E. coli</i> O157:H7	Destructivo	NC	porciones representativas de los lotes de producción (5 submuestras de 150 g) hasta completar 750 g	ausencia	1 muestra por mes para productores de menos de 50.000 Kg y 2 muestras por mes para productores de más de 50.000 Kg	RedILab Senasa
		Carne picada	<i>E. coli</i> O157:H7	Destructivo	NC	porciones representativas de los lotes de producción (5 submuestras de 150 g) hasta completar 750 g	ausencia	1 muestra por mes para productores de menos de 50.000 Kg y 4 muestras por mes para elaboradores de más de 50.000 Kg	RedILab Senasa

NORMATIVA	DESTINO DE EXPORTACIÓN	PRODUCTO	MICROORGANISMOS	MÉTODO DE MUESTREO	SUPERFICIE	CANTIDAD DE MUESTRAS	CRITERIO MICROBIOLÓGICO	FRECUENCIA	LABORATORIO DE ANÁLISIS
Circular Senasa USA 4210B		Carne cruda intacta. Actualmente destino habilitado solamente para carne cruda intacta.	<i>E. coli</i> O157:H7 <i>STEC</i> no O157 <i>Salmonella</i> spp.	Destruktivo	NC	Según Anexo III de la circular	ausencia	3 muestras mensuales para producción 23.000 a 114.000 kg/mes. Para mantener el destino, si no exporta, por temas comerciales es necesario realizar una muestra por mes.	DILAB Senasa
								2 muestras mensuales para producción 2.722 a 23.000 kg/mes. Para mantener el destino, si no exporta, por temas comerciales es necesario realizar una muestra por mes.	DILAB Senasa
								2 muestras mensuales para producción de 1.361 a 2.721 kg/mes. Para mantener el destino, si no exporta, por temas comerciales es necesario realizar una muestra por mes.	DILAB Senasa
								2 muestras mensuales para producción de 454 a 1.360 kg/mes. Para mantener el destino, si no exporta, por temas comerciales es necesario realizar una muestra por mes.	DILAB Senasa
								1 muestra mensual para producción de hasta 453 kg/mes. Para mantener el destino, si no exporta, por temas comerciales es necesario realizar una muestra por mes.	DILAB Senasa
Reglamento CE 2073/2005 Circular Senasa 4176	UE	Media res	<i>Salmonella</i> spp.	Esponjado abrasivo	400 cm <sup>2</sup> 4 localizaciones por canal de 100 cm <sup>2</sup> (4 x 100 cm <sup>2</sup> = total 400 cm <sup>2</sup> ) (Zonas a definir según ISO17604)	5 (medias reses)	ausencia n= 50 c = 2 10 semanas = 50 muestras	1 vez por semana. El día de la muestra cambiará cada semana. Luego de 6 semanas consecutivas con resultados satisfactorios se puede disminuir el muestreo cada 2 semanas. Después del faenado y antes de la aplicación de ácido láctico y del enfriamiento.	privado (puede ser del frigorífico). Bajo auditoria del SIV
			Bacterias aerobias mesófilas	Destruktivo	20 cm <sup>2</sup> 4 localizaciones por canal de 5 cm <sup>2</sup> (4 x 5 cm <sup>2</sup> = total 20 cm <sup>2</sup> ) (Zonas a definir según ISO17604)	5 (medias reses)	m: 3,5 log UFC/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria M: 5,0 log UFC/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria		
			Bacterias aerobias mesófilas	No destructivo	400 cm <sup>2</sup> (4 localizaciones por canal de 100 cm <sup>2</sup> ) (Zonas a definir según ISO17604)	5 (medias reses)	m: 3,5 log UFC/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria M: 5,0 log UFC/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria		
			Enterobacterias	Destruktivo	20 cm <sup>2</sup> 4 localizaciones por canal de 5 cm <sup>2</sup> (4 x 5 cm <sup>2</sup> = total 20 cm <sup>2</sup> ) (Zonas a definir según ISO17604)	5 (medias reses)	m: 1,5 log UFC/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria M: 2,5 log UFC/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria		
			Enterobacterias	No destructivo	400 cm <sup>2</sup> (4 localizaciones por canal de 100 cm <sup>2</sup> ) (Zonas a definir según ISO17604)	5 (medias reses)	m: 1,5 log UFC/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria M: 2,5 log UFC/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria		

NORMATIVA	DESTINO DE EXPORTACIÓN	PRODUCTO	MICROORGANISMOS	MÉTODO DE MUESTREO	SUPERFICIE	CANTIDAD DE MUESTRAS	CRITERIO MICROBIOLÓGICO	FRECUENCIA	LABORATORIO DE ANÁLISIS
Circular Senasa 3940	Unión aduanera: Rusia, República de Bielorrusia y República de Kazajistán	Carne enfriada en cortes (con o sin hueso), envasada al vacío o en atmósfera gaseosa modificada	Enterobacterias (coliformes) en 0,01 g / patógenos, incluyendo <i>Salmonella</i> en 25 g / <i>L. monocytogenes</i> en 25 g / clostridios sulfito reductores en 0,01 g	destrutivo	NC	ND	ausencia	ND	ND
			Bacterias aerobias mesófilas	Destruktivo	NC	ND	hasta 1 x 10 <sup>4</sup> UFC/g	ND	ND
			levaduras	Destruktivo	NC	ND	hasta 1 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	ND	ND
		Carne congelada en reces, medianas reces, cuartos, cortes.	Enterobacterias (coliformes) en 0,01 g / patógenos, incluyendo <i>Salmonella</i> en 25 g / <i>L. monocytogenes</i> en 25 g	Destruktivo	NC	ND	ausencia	ND	ND
			Bacterias aerobias mesófilas	Destruktivo	NC	ND	hasta 1 x 10 <sup>4</sup> UFC/g	ND	ND
		Carne picada bovina (enfriada, congelada)	Enterobacterias (coliformes) en 0,0001 g / patógenos, incluyendo <i>Salmonella</i> en 25 g / <i>L. monocytogenes</i> en 25 g	Destruktivo	NC	ND	ausencia	ND	ND
			Bacterias aerobias mesófilas	Destruktivo	NC	ND	hasta 5 x 10 <sup>6</sup> UFC/g	ND	ND
		Menudencias de animales de faena enfriados, congelados, congelados en block.	patógenos, incluyendo <i>Salmonella</i> en 25 g / <i>L. monocytogenes</i> en 25 g	Destruktivo	NC	ND	ausencia (preparación de la muestra con flameado de blocks congelados).	ND	ND
Circular Senasa 4274/2017A	China	Carne bovina fresca congelada	Bacterias aerobias mesófilas	La Circular Senasa 4274/2017 remite a la Circular 4176 relativo a los criterios microbiológicos aplicables en productos alimenticios CE 2073/2005.					
			Enterobacterias	Por lo tanto en estos puntos ver Reglamento CE 2073/2005 Circular Senasa 4176.					
			<i>Salmonella</i> spp.						
		Triming y recortes (Circular 3834)	<i>E. coli</i> O157:H7	Ver circular SENASA 3834					

NORMATIVA	DESTINO DE EXPORTACIÓN	PRODUCTO	MICROORGANISMOS	MÉTODO DE MUESTREO	SUPERFICIE	CANTIDAD DE MUESTRAS	CRITERIO MICROBIOLÓGICO	FRECUENCIA	LABORATORIO DE ANÁLISIS
Orden de Servicio 2/2016	Israel	MICK y/o Trimming KOSHER	Microorganismos aerobios totales a 30°C	Destructivo	NC	ND	< 200.000 UFC/g	Al menos un muestreo por cada embarque de hasta 500 Kg, previo al congelamiento en los cortes ya envasados.	RedILab Senasa
			<i>E. coli</i>				< 10 UFC/g		
			Estafilococos coagulasa +				< 50 UFC/g		
			<i>Salmonella</i> ssp.				ausencia en 25 g		
			<i>E. coli</i> O157:H7				ausencia en 325 g		
ME-2019-385 07166-APN-DYCPOA #SENASA	Israel	Carne bovina fresca / congelada	STEC (remite a la circular 4210B)	Destructivo	NC	Según Anexo III de la circular 4210B	ausencia	3 muestras mensuales para producción 23.000 a 114.000 Kg/mes. Para mantener el destino, si no exporta, por temas comerciales es necesario realizar una muestra por mes.	RedILab Senasa
								2 muestras mensuales para producción 2.722 a 23.000 Kg/mes. Para mantener el destino, si no exporta, por temas comerciales es necesario realizar una muestra por mes.	
								2 muestras mensuales para producción de 1.361 a 2.721 Kg/mes. Para mantener el destino, si no exporta, por temas comerciales es necesario realizar una muestra por mes.	
								2 muestras mensuales para producción de 454 a 1.360 Kg/mes. Para mantener el destino, si no exporta, por temas comerciales es necesario realizar una muestra por mes.	
								1 muestra mensual para producción de hasta 453 Kg/mes. Para mantener el destino, si no exporta, por temas comerciales es necesario realizar una muestra por mes.	
Circular Senasa 4365	Colombia	Media res (Circular 3834)	<i>E. coli</i> O157:H7	Esponjado o hisopado	4 x 100 cm <sup>2</sup> = 400 cm <sup>2</sup> (nalga, ijada, pecho y cogote)	1	ausencia	mensual	RedILab Senasa
				Destructivo	Trozo de superficie muscular de 10 x 10 cm. 4 x 100 cm <sup>2</sup> = 400 cm <sup>2</sup> (nalga, ijada, pecho y cogote)	1	ausencia	mensual	RedILab Senasa
		Media res (Circular 3259)	<i>E. coli</i>	Esponjado	300 cm <sup>2</sup> (flanco, pecho, cuarto trasero) en ese orden 3 x 100 cm <sup>2</sup>	1 cada 300 reses	Rango Aceptable = promedio más un desvío estándar m = valores obtenidos entre el rango aceptable y M M = mayor al promedio más tres desvíos estándar n = 13 c = 3	1 prueba cada 300 reses, con un mínimo de 1 muestra por semana de operación.	privado (puede ser del frigorífico)
				Destructivo	20 cm de largo x 15 cm de ancho y 10 cm de grosor (flanco, pecho, cuarto trasero)	1 cada 300 reses	n = 13 m = negativo M = > 100 UFC/cm <sup>2</sup> c = 3	1 prueba cada 300 reses con un mínimo de 1 muestra por semana de operación.	privado (puede ser del frigorífico)

NORMATIVA	DESTINO DE EXPORTACIÓN	PRODUCTO	MICROORGANISMOS	MÉTODO DE MUESTREO	SUPERFICIE	CANTIDAD DE MUESTRAS	CRITERIO MICROBIOLÓGICO	FRECUENCIA	LABORATORIO DE ANÁLISIS
Circular Senasa 4365	Colombia	Media res después de 12 h o más de la faena (circular 4245)	<i>Salmonella</i> spp.	Esponjado	300 cm <sup>2</sup> (flanco, pecho, cuarto trasero) En ese orden	82	ausencia n = 83 c = 1	1 set de 82 muestras al año. Cumplido este requisito, el resto del año se tomarán muestras mensuales al azar (1 por mes)	RedLab Senasa
		Triming y carne picada (según circular 4210)	<i>E. coli</i> O157:H7 STEC no O157 <i>Salmonella</i> spp.	Destruktivo	NC	Según Anexo III de la circular	ausencia	3 muestras mensuales para producción 23.000 a 114.000 Kg/mes. Para mantener el destino, si no exporta, por temas comerciales es necesario realizar una muestra por mes.	DILAB Senasa
								2 muestras mensuales para producción 2.722 a 23.000 kg/mes. Para mantener el destino, si no exporta, por temas comerciales es necesario realizar una muestra por mes.	
								2 muestras mensuales para producción de 1.361 a 2.721 Kg/mes. Para mantener el destino, si no exporta, por temas comerciales es necesario realizar una muestra por mes.	
								2 muestras mensuales para producción de 454 a 1.360 Kg/mes. Para mantener el destino, si no exporta, por temas comerciales es necesario realizar una muestra por mes.	
								1 muestra mensual para producción de hasta 453 Kg/mes. Para mantener el destino, si no exporta, por temas comerciales es necesario realizar una muestra por mes.	
Circular Senasa 4221	Canadá	Media res	<i>E. coli</i> O157:H7/NM	Destruktivo	NC	Mínimo de 60 sub-muestras por lote con un mínimo de 325 g. Material recolectado de la superficie exterior del producto.	ausencia	1 muestra por lote de producción comprendido entre un pre-operacional y el siguiente siempre que no supere los 4.500 Kg.	Laboratorio acreditado por el OAA
		Carne picada	<i>E. coli</i> O157:H7/NM	Destruktivo	NC	Cinco sub-unidades de muestra de 65 g cada una (325 g total)	ausencia	1 muestra por lote de producción comprendido entre un pre-operacional y el siguiente siempre que no supere los 4.500 Kg.	Laboratorio acreditado por el OAA
		Recortes	<i>E. coli</i> O157:H7/NM	Destruktivo	NC	60 porciones de recortes para tener un total de 325 g	ausencia	1 muestra por lote de producción comprendido entre un pre-operacional y el siguiente siempre que no supere los 4.500 Kg.	Laboratorio acreditado por el OAA

A: remite a la Circular 4176 relativo a los criterios microbiológicos aplicables en productos alimenticios CE 2073/2005.

NC: no corresponde

ND: no definido en la normativa

## MUESTREOS PARA CONTROL INTERNO DE PROCESOS

Los establecimientos tienen sus propios planes de muestreo como control interno de procesos y verificación de pre-requisitos, los cuales pueden incluir:

- **Productos:** medias reses, cuartos, cortes, recortes y hamburguesas, entre otros. Se pueden realizar análisis microbiológicos, físico-químicos y de residuos veterinarios complementarios a los muestreos oficiales.
- **Ambiente:** verificación de POES en entornos y superficies de trabajo (ver capítulo IX).
- **Agua:** ver capítulo X.

### El diseño de los planes de muestreo interno debe considerar:

- Normativa nacional.
- Normativa de los países de destino.
- Requerimientos y directrices de clientes.
- Directrices Generales sobre muestreo (Codex CAC/GL 50-2004).
- Bibliografía disponible (nacional e internacional).
- Datos históricos del establecimiento.

En las siguientes tablas se presentan algunos ejemplos de muestreos internos para plantas frigoríficas bovinas (cada planta debe establecer sus muestreos internos de autocontrol según tipo de producto y destino):

**Tabla 19.** Criterios microbiológicos internos para medias reses.

**Tabla 20.** Criterios microbiológicos internos para cortes anatómicos.

**Tabla 21.** Criterios microbiológicos internos para recortes (*trimmings*).

**Tabla 22.** Criterios microbiológicos para carne picada, carne porcionada y materia prima.

**Tabla 19.** Criterios microbiológicos internos para medias reses.

Producto	Análisis	Requisito	Frecuencia	Método de muestreo	Toma de muestra	Método Análisis	Técnica de análisis	Norma	Límite	Fase en la que se aplica el criterio
medias reses	<i>E. coli</i> genérico	USA	1 muestra cada 300 cabezas	Esponjado	3 sectores de 100 cm <sup>2</sup> c/u	Individual	ver capítulo VII	USDA MLG 3.02	3 muestras > m* en 13 o 1 muestra > M* en 13	Preferentemente canales después de 12 o más horas de faena.
	<i>Salmonella</i> spp.	UE China	5 muestras cada 2 semanas	Esponjado	4 sectores de 100 cm <sup>2</sup> c/u	Individual	ver capítulo VIII	ISO 6579	satisfactorio, si la presencia de <i>Salmonella</i> se detecta en un máximo de 2/50 muestras	Las muestras deben tomarse en canales SIN ácido láctico o ANTES de la aplicación del mismo y del ingreso a Cámaras. 100 (+) en 65 g (+) en 25 g
	Bacterias aerobias mesófilas	UE China	5 muestras cada 2 semanas	Destructivo	4 bocados de 5 cm <sup>2</sup> c/u	Individual	ver capítulo VII	ISO 4833	media logarítmica diaria: m: 3,5 log (3300 UFC/cm <sup>2</sup> ) M: 5 log (100000 UFC/cm <sup>2</sup> )	
	Enterobacterias	UE China	5 muestras cada 2 semanas	Destructivo	4 bocados de 5 cm <sup>2</sup> c/u	Individual	ver capítulo VII	ISO 21528-2	media logarítmica diaria: m: 1,5 log (40 UFC/cm <sup>2</sup> ) M: 2,5 log (350 UFC/cm <sup>2</sup> )	
	<i>E.coli</i> O157:H7	China	5 muestras cada 2 semanas	Esponjado	4 sectores de 100 cm <sup>2</sup> c/u	Individual	ver capítulo VIII	USDA MLG 5C.03	ausencia en 400 cm <sup>2</sup>	
	STEC (stx)	Interno	5 muestras cada 2 semanas	Esponjado	4 sectores de 100 cm <sup>2</sup> c/u	Individual	ver capítulo VIII	USDA MLG 5C.03 ISO 13136	ausencia en 400 cm <sup>2</sup>	

\* m= UFC/cm<sup>2</sup> AVG mejor año + 1 DESV o M= UFC/cm<sup>2</sup> AVG mejor año + 3 DESV

<sup>a</sup> utilizar cualquier técnica validada para el recuento o detección del microorganismos blanco que se adecúe a los requerimientos. En los capítulos VII y VIII se presentan los métodos rápidos disponibles en la Argentina en octubre de 2023

**Tabla 20.** Criterios microbiológicos internos para cortes anatómicos.

Producto	Análisis	Requisito	Frecuencia	Método de muestreo	Cantidad por muestra	Método de análisis	Técnica de análisis	Norma	Límite	Fase en la que se aplica el criterio
Cortes de Exportación: lomo, corazón de cuadril, tapa de cuadril, bife ancho, bife angosto.	<i>E. coli</i> genérico	Internos Internos Internos Internos Internos Internos	5 cortes por día de producción por destino comercial*	Destruktivo	25 g	Individual	ver capítulo VII	ISO 16649-2	100 UFC/g	Solo al final del proceso de fabricación excepto patógenos.
	Bacterias aerobias mesófilas				25 g		ver capítulo VII	ISO 4833	100000 UFC/g	
	Coliformes				25 g		ver capítulo VII	ISO 4832	500 UFC/g	
	STEC (stx)				25 g/325 g	pool de 5 muestras	ver capítulo VIII	USDA MLG 5C.03	ausencia en 25 g/325 g	
	<i>Salmonella</i> spp.				25 g/325 g		ver capítulo VIII	ISO 6579	ausencia en 25 g/325 g	
	<i>S. aureus</i>		A pedido		25 g	A pedido	ver capítulo VII	ISO 6888-1	100 UFC/g	
Cortes de Consumo	<i>E. coli</i> genérico	Internos Internos Internos Internos Internos Internos	5 cortes por día de producción por cliente*	Destruktivo Destruktivo Destruktivo Destruktivo Destruktivo Destruktivo	25 g	Individual	ver capítulo VII	ISO 16649-2	100 UFC/g	Solo al final del proceso de fabricación excepto patógenos.
	Bacterias aerobias mesófilas				25 g		ver capítulo VII	ISO 4833	100000 UFC/g	
	Coliformes				25 g		ver capítulo VII	ISO 4832	500 UFC/g	
	STEC TOP SEVEN				25 g/325 g	pool de 5 muestras	ver capítulo VIII	USDA MLG 5C.03	ausencia en 25 g/325 g	
	<i>Salmonella</i> spp.				25 g/325 g		ver capítulo VIII	ISO 6579	ausencia en 25 g/325 g	
	<i>S. aureus</i>		A pedido		25 g	A pedido	ver capítulo VII	ISO 6888-1	100 UFC/g	

\* Tomar un set de 5 muestras de 5 cortes distintos individuales para cada destino comercial

<sup>a</sup> utilizar cualquier técnica validada para el recuento o detección del microorganismos blanco que se adecúe a los requerimientos. En los capítulos VII y VIII se presentan los métodos rápidos disponibles en la Argentina en octubre de 2023

**Tabla 21. Criterios microbiológicos internos para recortes (*trimmings*).**

Producto	Análisis	Requisito	Frecuencia	Método de muestreo	Cantidad por muestra	Método de análisis	Técnica de análisis	Norma	Límite
Recortes	<i>E. coli</i> genérico	Interno	1 muestra por lote de producción	Destruktivo	25 g	pool de 3 horas, una muestra por turno	ver capítulo VII	ISO 16649-2	100 UFC/g
	Bacterias aerobias mesófilas	Interno		Destruktivo	25 g		ver capítulo VII	ISO 4833	100000 UFC/g
	<i>S. aureus</i>	A Pedido		Destruktivo	25 g		ver capítulo VII	ISO 6888-1	100 UFC/g
	Coliformes	Interno		Destruktivo	25 g		ver capítulo VII	ISO 4832	300 UFC/g
	<i>Salmonella</i> spp.	Interno		Destruktivo	325 g	N60	ver capítulo VIII	ISO 6579	ausencia en 325 g
	STEC TOP SEVEN	USA / Interno		Destruktivo	325 g	N60	ver capítulo VIII	USDA MLG 5C.03	ausencia en 325 g

<sup>a</sup> utilizar cualquier técnica validada para el recuento o detección del microorganismos blanco que se adecúe a los requerimientos.

En los capítulos VII y VIII se presentan los métodos rápidos disponibles en la Argentina en octubre de 2023

**Tabla 22.** Criterios microbiológicos para carne picada, carne porcionada y materia prima.

Producto	Análisis	Requisito	Frecuencia	Método de muestreo	Cantidad por muestra	Método de análisis	Técnica de análisis	Norma	Límite
Carne picada	<i>E. coli</i> genérico	Interno	1 muestra por lote de producción	Destruktivo	25 g	Individual	ver capítulo VII	ISO 16649-2	100 UFC/g
	Bacterias aerobias mesófilas	Interno		Destruktivo	25 g	Individual	ver capítulo VII	ISO 4833	100000 UFC/g
	Coliformes	Interno		Destruktivo	25 g	Individual	ver capítulo VII	ISO 4832	500 UFC/g
	STEC TOP SEVEN	Interno		Destruktivo	325 g	Individual	ver capítulo VIII	USDA MLG 5C.03	ausencia en 325 g
	<i>Salmonella</i> spp.	Interno		Destruktivo	325 g	Individual	ver capítulo VIII	ISO 6579	ausencia en 325 g
	<i>S. aureus</i>	Interno	A pedido	Destruktivo	25 g	Individual	ver capítulo VII	ISO 6888-1	100 UFC/g
Carne porcionada	<i>E. coli</i> genérico	Interno	1 muestra por lote de producción	Destruktivo	25 g	Individual	ver capítulo VII	ISO 16649-2	100 UFC/g
	Bacterias aerobias mesófilas	Interno		Destruktivo	25 g	Individual	ver capítulo VII	ISO 4833	100000 UFC/g
	Coliformes	Interno		Destruktivo	25 g	Individual	ver capítulo VII	ISO 4832	500 UFC/g
	STEC TOP SEVEN	Interno		Destruktivo	325 g	Individual	ver capítulo VIII	USDA MLG 5C.03	ausencia en 325 g
	<i>Salmonella</i> spp.	Interno		Destruktivo	325 g	Individual	ver capítulo VIII	ISO 6579	ausencia en 325 g
	<i>S. aureus</i>	Interno	A pedido	Destruktivo	25 g	Individual	ver capítulo VII	ISO 6888-1	100 UFC/g
Materia Prima	<i>E. coli</i> genérico	Interno	5 cortes por día de producción	Destruktivo	25 g	Pool de 3 muestras	ver capítulo VII	ISO 16649-2	100 UFC/g
	Bacterias aerobias mesófilas	Interno		Destruktivo	25 g		ver capítulo VII	ISO 4833	100000 UFC/g
	Coliformes	Interno		Destruktivo	25 g		ver capítulo VII	ISO 4832	500 UFC/g
	<i>E. coli</i> O157:H7	Interno		Destruktivo	325 g		ver capítulo VIII	USDA MLG 5C.03	ausencia en 325 g
	STEC TOP SEVEN	Interno		Destruktivo	325 g		ver capítulo VIII	USDA MLG 5C.03	ausencia en 325 g
	<i>Salmonella</i> spp.	Interno		Destruktivo	325 g		ver capítulo VIII	ISO 6579	ausencia en 325 g
	<i>S. aureus</i>	Interno	A pedido	Destruktivo	25 g		ver capítulo VII	ISO 6888-1	100 UFC/g

<sup>a</sup> utilizar cualquier técnica validada para el recuento o detección del microorganismos blanco que se adecúe a los requerimientos. En los capítulos VII y VIII se presentan los métodos rápidos disponibles en la Argentina en octubre de 2023

## RECOLECCION DE MUESTRAS

La toma de muestras es el punto de partida para una correcta realización de los ensayos microbiológicos, por lo que a los fines de obtener resultados confiables es preciso que la misma incluya no sólo el proceso de toma como tal, sino aspectos tales como el diseño y empleo de registro de datos, aspectos relacionados con las condiciones de transporte, conservación y almacenamiento que eviten la alteración o degradación de las muestras, y aspectos relacionados con la custodia y trazabilidad de las muestras. Algunos de los aspectos básicos a considerar para una correcta toma de muestras se indican a continuación:

**- El personal.** La persona que realiza los muestreos debe tener las competencias necesarias para tal fin, además de presentarse a los lugares de toma de muestra con una correcta higiene personal (uñas, ropa y bata limpias) a los fines de evitar algún tipo de contaminación cruzada producto de la mala higiene del analista.

**- La planificación.** Cada toma de muestras debe planificarse de manera previa, por sencilla que sea, ya que es necesario que el responsable de muestreo conozca el tipo de muestra a recolectar, los puntos de muestreo, los dispositivos a utilizar, las técnicas de muestreo, la cantidad de muestras, la temperatura de almacenamiento y transporte de las muestras y todo lo referente al muestreo antes de su realización.

**- Los materiales.** Se debe realizar un adecuado alistamiento de los materiales, de manera de contar con todos los insumos y herramientas necesarias para llevar a cabo el muestreo (elementos de protección personal, bolsas estériles, stickers para identificación, rotuladores, neveras portátiles con temperaturas ideales para el transporte o geles de refrigeración, hisopos y/o esponjas, y todo el material que vaya a ser utilizado para el muestreo).

**- La técnica.** Para la toma de muestras siempre se deben priorizar las superficies expuestas del producto. El muestreo de bacterias patógenas (análisis cualitativos) se debe realizar con la intención de “querer encontrar al patógeno” para lo cual se es recomendable tomar muestras de la mayor superficie posible para mejorar la probabilidad de detección. Por ejemplo, si el objetivo es recolectar muestras de media res para análisis de STEC, se deben esponjar especialmente las zonas potencialmente contaminadas (cogote, pelvis, línea de aserrado).

**- La asepsia.** Al momento del muestreo se deben tener las mayores precauciones de asepsia de manera de evitar posibles contaminaciones cruzadas, por lo que es recomendable higienizar constantemente los guantes con alcohol 70% y evitar que superficies no estériles entren en contacto con la muestra a analizar.

**- Los procedimientos internos.** Cada laboratorio debe tener un procedimiento interno de toma de muestra, con todas las indicaciones, procedimientos complementarios y técnicas que realizan los responsables de muestreo, como así también garantizar la cadena de custodia de toda muestra que ingresa al laboratorio.

**- Representatividad del lote.** Las muestras deben ofrecer información sobre determinadas características del lote. Se recurre a metodología estadística internacional, tablas o fórmulas con fundamento científico para la toma y selección de la muestra.

Las estrategias para la recolección de muestras se pueden clasificar según su diseño en:

- Aleatoria: adecuada para producciones mayores, donde se asigna un numero a cada producto y por números aleatorios, se seleccionan al azar las muestras que serán analizadas, teniendo la misma posibilidad de ser elegida cualquiera de las unidades que conforman el lote.

- Geométrica: adecuada para muestras a granel y que se presentan en contenedores, de los cuales es factible tomar muestras de los extremos y del punto central.

- Producción-tiempo: adecuada para tomar la muestra directamente de la línea de producción, establecer el tiempo en que se toma cada muestra. Por ejemplo, en una producción de hamburguesas, con una producción de 12 h, se tomará una muestra cada hora.

- **Contramuestra.** En muestras oficiales o en caso de ser necesario se deben tomar contramuestras bajo las mismas condiciones que las muestras. Estas serán conservadas en las mismas condiciones según corresponda.

- **Identificación.** Las muestras deben estar bien identificadas en el envase y en los registros.

- **Protección.** Las muestras deben estar protegidas de contaminaciones externas y no deben sufrir daño o transformación durante el transporte. Es ideal enviarla al laboratorio en su recipiente original sin ser alterado.

- **Tiempo.** El tiempo que transcurre entre la toma de las muestras y su análisis debe ser lo más breve y razonable posible. Durante el transporte al laboratorio, las condiciones (temperatura) no deben permitir que aumente o disminuya la cantidad del organismo que se trata, de forma que los resultados reflejen (dentro de las limitaciones establecidas en el plan de muestreo) las condiciones microbiológicas del lote.

## METODOS PARA LA RECOLECCION DE MUESTRAS

### Método destructivo:

El muestreo se realiza por corte superficial con cuchillo, bisturí o tijeras estériles hasta una profundidad de 0,5 cm de la superficie del corte de carne, de la media res o del cuarto. Con el método destructivo se

pueden extraer muestras para análisis cualitativos o cuantitativos.

En el caso de productos congelados, el muestreo se efectúa mediante la utilización de taladro con mecha estéril (mecha paleta de 1" o similar para muestras superficiales), recolector y bolsa estériles, efectuándose no menos de 12 perforaciones en un bloque de carne congelada de aproximadamente 27 Kg.

La unidad de muestreo debe tener un tamaño mínimo de 400 g a 500 g (según metodología), que permita el análisis de indicadores y patógenos.

Luego del análisis, el resultado de microorganismos indicadores obtenidos por este método se expresa en UFC/g y el resultado para análisis de patógenos se expresa presencia o ausencia.

### **Método destructivo en cortes y recortes para recuento de indicadores:**

- **Opción 1.** Se desinfecta la mesada de trabajo con un algodón humedecido con alcohol al 70%. Se coloca el corte sobre la mesada y asépticamente se extrae una muestra de <5 mm de profundidad (25 g de carne) evitando repetir la extracción de carne de lugares ya muestreados del corte.

- **Opción 2.** Se colocan los trozos cortados en una bolsa estéril y se rotula con los datos necesarios para su posterior identificación. En el caso que el corte de carne se encuentre envasado se debe desinfectar previamente la superficie del envase por donde se cortará para extraer una muestra superficial del corte anatómico y pesar 10 o 25 g en laboratorio.

- **Opción 3.** También puede utilizarse una plantilla para delimitar una superficie de 20 cm<sup>2</sup> y extraer la muestra. En este caso, los resultados se expresan en UFC/cm<sup>2</sup>. Otra alternativa es el uso de un sacabocado, con borde afilado de 5 cm<sup>2</sup> (2,5 cm de diá-

metro interno) y desinfectado, para marcar la superficie de extracción y luego poder operar con mayor facilidad.

### **Método destructivo en cortes y recortes para análisis de patógenos:**

- **Opción 1.** En otra bolsa estéril se colocan trozos de carne de <5 mm de profundidad y de 25, 65 o 325 g de carne, según lo requiera la especificación. No se debe extraer la muestra de aquellas superficies del corte anatómico que ya fueron muestreadas. Luego de extraer la muestra para análisis microbiológico se recomienda determinar y registrar el pH y la temperatura del corte anatómico.
- **Opción 2. N60.** se usa para carne no intacta y con un procesamiento posterior con destino USA (FSIS Directive 10010.1 Rev5 MT51). Consiste en la toma de 60 recortes cárnicos de 3x8 cm que tengan un peso final cercano a los 325 g (si la muestra pesase más, igualmente deben analizarse en su totalidad los 60 trozos). En el anexo 3 se describe la toma de muestras utilizando este método.

### **Muestreo con esponja**

Se utilizan esponjas abrasivas estériles, colocadas en bolsas estériles de cierre hermético, a las cuales se les debe agregar 10 ml de agua peptonada 0,1% como medio de transporte o dilución. Se recomienda que las bolsas tengan filtro, ya que la presencia de alto contenido de materia grasa o pequeñas partículas de muestra, pueden causar inconvenientes en el procesamiento analítico e interferencias en la posterior lectura de la placa. También se pueden utilizar esponjas pre-hidratadas en bolsas preferentemente con filtro.

Para que los resultados sean comparables a lo largo del tiempo, se debe usar el mismo tipo de esponja para cada análisis, ya que una esponja de celulosa expandida tendrá una abrasividad diferente a una de poliuretano o de otro material.

Las esponjas deben retirarse de manera aséptica de su recipiente utilizando guantes o pinzas estériles, o manipulando el recipiente para acceder al mango del dispositivo. Se debe tener cuidado de no contaminar la esponja o cualquier otra parte del dispositivo que se volverá a introducir en el recipiente.

Luego del análisis, el resultado de microorganismos indicadores obtenidos por este método se expresa en UFC/cm<sup>2</sup> y el resultado para análisis de patógenos se expresa presencia (detectado) o ausencia (no detectado).

### **Esponjado de media res o corte anatómico para recuento de indicadores:**

Mediante el uso de una plantilla, se delimita la superficie a muestrear 100 cm<sup>2</sup>. El responsable de recolectar la muestra puede escurrir la esponja dentro de la bolsa antes de proceder a muestrear la superficie, realizando al menos 10 movimientos verticales, 10 horizontales y 10 transversales. Con la misma esponja se puede esponjar hasta 4 zonas de la media res, utilizando las diferentes superficies de la esponja para cada zona de la media res.

Finalizada la recolección, se cierra la bolsa, se masajea la esponja y se rotula. En el laboratorio se completa el volumen de medio de transporte (si fuera necesario), y se mantiene la muestra refrigerada hasta su procesamiento o remisión a laboratorio externo.

### **Esponjado de media res o corte anatómico para análisis de patógenos:**

- Media res: se realiza el esponjado de toda la superficie externa de la media res 10 veces en sentido vertical y 10 veces en sentido horizontal, y con la otra cara de la esponja, toda la parte interna en ambas direcciones.
- Cortes anatómicos: se realiza el esponjado de toda la superficie externa del corte

anatómico 10 veces en sentido vertical y 10 veces en sentido horizontal.

Finalizada la recolección, se cierra la bolsa, se masajea la esponja y se rotula. En el laboratorio se completa el volumen de medio de transporte (si fuera necesario), y se mantiene la muestra refrigerada hasta su procesamiento o remisión a laboratorio externo.

### **Muestreo con hisopo para recuento de indicadores**

Los hisopos son dispositivos de muestreo que consisten en una punta o cabeza (que puede ser de alginato, dacrón, rayón o algodón) para recolectar la muestra unida a un extensor largo y flexible. Se envasan individualmente en tubos a los cuales se les debe agregar 10 ml de agua peptonada 0,1% como medio de transporte o dilución.

El analista humedece el hisopo en el medio y realiza 30 movimientos sobre una superficie de 100 cm<sup>2</sup> (media res o cortes anatómicos), en sentido vertical, horizontal y diagonal (10 en cada uno de ellos) girando el hisopo sobre su eje.

Una vez finalizado el muestreo, el hisopo se introduce en el medio, se cierra el tubo y se refrigerara hasta su procesamiento en el laboratorio o remisión a laboratorio externo. Los resultados se expresan en UFC/cm<sup>2</sup>.

### **Muestreo con paño para recortes**

Este método se usa como alternativa al método destructivo N60. Se basa en el uso de un paño especial estéril que no desprende pelusa (Micro Tally®) y se puede usar tanto en forma manual en canastos como automatizada en la línea de producción. Es un método utilizado en USA y actualmente no aplica a los productos exportados a este destino para muestras de carácter oficial.

## **MATERIALES PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS**

- **Bolsa estéril con esponja.** La capacidad debe ser la adecuada para tomar la unidad de muestra deseada.



- **Hisopos con tubos de ensayo/hisopos con medio de transporte.** Se recomienda no utilizar hisopos de madera ni tubos de vidrio en sectores de producción de alimentos.



- **Guantes estériles.**



- **Taladro, mechas, cuchillos y recipientes estériles.**



- Frascos de vidrios o plástico de boca ancha estériles.



- Conservadora para transporte de muestras y materiales.



#### **- Refrigerantes.**



- Rótulos para identificar muestras. Los rótulos podrán incluir la información que se considere conveniente.

<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hora de muestreo y fecha:</li> <li>- Especie:</li> <li>- Tropa:</li> <li>- Garrón:</li> <li>- Lote:</li> <li>- Destino:</li> <li>- Sector de producción:</li> <li>- Sector de extracción:</li> <li>- Sub-sector de extracción:</li> <li>- Nombre y marca del producto muestreado:</li> <li>- N° de caja y código de producto:</li> <li>- Fecha de elaboración del producto:</li> <li>- Descripción de la muestra:</li> <li>- Esponjado de media res (<math>\text{cm}^2</math> de superficie).</li> <li>- Hisopado de media res (<math>\text{cm}^2</math> de superficie).</li> <li>- Destructivo de <math>20 \text{ cm}^2</math> de superficie (4 zonas de <math>5 \text{ cm}^2</math> cada una)</li> <li>- Método de conservación:</li> <li>- Análisis solicitado por/área:</li> <li>- Tipo de análisis solicitado:</li> <li>- Observaciones:</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Escalera de material no poroso (aluminio o acero inoxidable).</li> </ul>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

- Escalera de material no poroso (aluminio o acero inoxidable).



- Solución de agua peptonada tamponada al 0,1% o diluyente de Butterfield.



- Plantillas delimitadoras de superficies. Son de acero inoxidable u otro material que no altere el alimento. Se encuentran disponibles de  $5 \text{ cm}^2$ ,  $20 \text{ cm}^2$  y  $100 \text{ cm}^2$  según se requiera. Antes de su uso deben ser esterilizados por calor seco o húmedo, o bien desinfectadas con alcohol 70% o equivalente. En caso de utilizar alcohol o desinfectantes, verificar que no queden restos, previo a tomar contacto con la muestra para evitar alterar el resultado analítico.



- Tijeras, pinzas y bisturíes estériles.



- Marcadores indelebles para el rotulado de etiquetas.



## CONSIDERACIONES PARA EL ENVIO DE MUESTRAS A LABORATORIOS EXTERNOS

**- Seleccionar laboratorios que aseguren la calidad de los resultados.** Los laboratorios deben estar acreditados bajo la Norma ISO/IEC 17025 (ver capítulo II).

**- Remisión de muestras.** El laboratorio debe desarrollar y proveer guías e instrucciones precisas para la recolección de muestras, ya sea para uso interno o para quienes las remitan desde otras instituciones. Estas instrucciones deben indicar las cantidades mínimas necesarias de cada tipo de muestra para llevar a cabo los análisis, así como las condiciones de conservación, transporte y estabilidad de las muestras desde el momento de su obtención hasta el arribo al laboratorio.

**- Temperatura de transporte.** Salvo que las normas específicas indiquen lo contrario, se recomiendan las siguientes temperaturas de transporte:

- productos estables a temperatura ambiente: por debajo de 40°C
- productos congelados o ultracongelados: -15 a -18°C
- productos refrigerados: 1 a 5°C

**- Identificación.** En el análisis es de suma importancia asegurar la identificación y la

integridad de una muestra que se remite al laboratorio. Así, las muestras y sus contramuestras deben rotularse adecuadamente para asegurar inequívocamente su identidad. Se recomienda verificar el correcto rotulado de la muestra, con nombre y apellido, tipo de muestra, condiciones de recolección, fecha y hora, entre otra información. Todos los rótulos y etiquetas deben efectuarse con elementos de escritura indelebles para evitar que se borren por efecto de la humedad o rotura de los envases. Registrar todos estos datos en dos copias: una que será archivada por quien lo deriva y la otra que será remitida al laboratorio que realizará el análisis. Si se registran en formato digital se debe considerar el resguardo de los datos bajo contraseña o programas de seguridad. Es conveniente acordar con el laboratorio externo el formato de la solicitud de análisis con el objetivo de asegurar que todos los datos queden registrados además de facilitar la carga de la información.

**- Transporte.** Debe asegurar las condiciones que minimicen cualquier tipo de alteración en el número de microorganismos presentes. No se utiliza hielo suelto ya que puede producir contaminación si el recipiente se rompe o tiene fugas. El traslado de la muestra debe efectuarse de manera tal que al llegar al laboratorio tenga las mismas condiciones que tenía en el momento de su recolección.

En la tabla 23 se presenta un resumen con los principales análisis requeridos por tipo de muestras y las condiciones para su envío al laboratorio.

**Tabla 23.** Cantidad mínima de muestra, temperatura y tiempo para el envío de muestras al laboratorio según análisis requerido.

<b>Tipo de muestra</b>	<b>Análisis</b>	<b>Cantidad mínima de muestra</b>	<b>Requisitos de temperatura</b>	<b>Tiempo desde la toma de muestra hasta su recepción en el laboratorio</b>
Agua	Microbiológico	500 ml	Refrigerado	< 24 h
	Físico-químico	500 ml	Refrigerado	< 24 h
	Contaminantes químicos	2000 ml	Refrigerado	< 7 días
Carne	Microbiológico	500 g <sup>1</sup>	Refrigerado	< 24 h <sup>2</sup>
		500 g <sup>1</sup>	Congelado	< 72 h <sup>3</sup>
	Residuos	250 g <sup>4</sup>	Congelado	< 25 días
Menudencias	Microbiológico	500 g	Refrigerado	< 24 h
		500 g	Congelado	< 72 h
	Residuos	250 g <sup>4</sup>	Congelado	< 25 días
Esponjado o hisopado	Microbiológico	Esponjas o hisopos	Refrigerado	< 24 h

Temperatura de congelación: -15 a -18°C.

Temperatura de refrigeración: 1 a 5°C.

<sup>1</sup> la cantidad mínima a enviar dependerá del producto (carne picada, *trimmings*, cortes), el microorganismo (*Salmonella* spp., *E. coli* O157, STEC) y la normativa a cumplir (USDA, UE, etc.). Se recomienda coordinar previamente con el laboratorio que realizará el análisis.

<sup>2</sup> para el cumplimiento de la Circular 4210B la DGLyCT-Senasa acepta muestras hasta 3 días.

<sup>3</sup> para el cumplimiento de la Circular 4210B la DGLyCT-Senasa acepta muestras hasta 5 días.

<sup>4</sup> en caso de muestras oficiales se debe respetar lo que indica la Orden de Muestreo.

## **Recomendaciones para el envío de caldos enriquecidos con screening positivo a patógenos.**

- Los caldos deben ser analizados en menos de 48 h. Se debe considerar que en un caldo de enriquecimiento (37-41,5°C por 24 h en agua peptonada) desarrollaron millones de bacterias presentes en el alimento. Las bacterias patógenas no son buenas competidoras. Por lo tanto, las chances de perder viabilidad son muy altas. Cuando existe necesidad de confirmar un screening positivo se recomienda enviar al laboratorio externo una contramuestra del mismo lote junto con una alícuota del caldo de enriquecimiento.
- Los caldos deben disponerse en embalajes de buena calidad y lo suficientemente fuertes para resistir los golpes y el peso que tienen que soportar durante el transporte.
- Los embalajes se deben estar correctamente cerrados para evitar cualquier fuga de contenido que pudiera producirse durante el transporte.

El embalaje debe constar de tres componentes:

• **recipiente primario:** con cierre hermético, debe envolverse con material absorbente adecuado para poder absorber todo el líquido del recipiente o recipientes primarios. Si se utilizan varios recipientes primarios éstos deberán envolverse individualmente o por separado para impedir el contacto entre ellos. Si se usan tapones a rosca, deben reforzarse con cinta adhesiva.

• **recipiente secundario:** con cierre hermético. Las bolsas refrigerantes o el hielo seco deben colocarse fuera del recipiente secundario. Si se usa hielo seco debe colocarse un soporte interno que mantenga el recipiente secundario en la posición original cuando el hielo se derrita.

• **recipiente exterior:** no debe contener más de 4 litros. De esa cantidad hay que excluir el hielo y/o el hielo seco. Incluir una lista detallada del contenido entre el reci-

piente secundario y el exterior. Asegurar su estanqueidad, tal como un cierre sellable por calor o un tapón con reborde.

## **MOTIVOS DE RECHAZO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO**

- Muestras derramadas, con envase abierto o dañado.
- Muestras con temperatura de conservación inadecuada.
- Muestras con bolsa de toma de muestra dañada o mal cerrada.
- Múltiples muestras dentro de una misma bolsa de toma de muestra.
- Imposibilidad de determinar la naturaleza de la muestra
- Falta de información suficiente para establecer los análisis que corresponden realizar.

Cantidad de muestra insuficiente para efectuar todos los ensayos correspondientes.

**NOTA:** El tratamiento que reciba la muestra durante el rotulado y la remisión al laboratorio va a influir fuertemente sobre los resultados obtenidos por lo que se presta especial cuidado en preservar la integridad de la muestra durante esta instancia. Todas las muestras que se tomen en los diferentes sectores, una vez obtenidas, inmediatamente se colocan en una conservadora, para su transporte al laboratorio.

### ANEXO 3. TOMA DE MUESTRAS UTILIZANDO EL MÉTODO N 60 PARA CARNE CONGELADA (MT51)

#### Kit básico de suministro de muestras

- 3 - Bolsas enrollables con cierre de línea de llenado estériles
- 1 - Bolsa con cierre de cremallera de 13x18" etiquetada como "No estéril"
- 1 - par de guantes estériles
- 3 - Sello facturable de FedEx: (EL, MWL, WL)
- 1 - Formulario FSIS 7355-2A/AB (conjunto de sellos de muestra)
- 1 - funda de plástico de 6" x 12"
- 1 - Contenedor de envío
- 1 o 2 - Paquete de gel refrigerante
- 1 o 2 - Separador de cartón
- 1 - Almohadilla absorbente
- 1 - Tapón de espuma



kit básico de suministro de muestras

#### Kit de suministros complementarios N60\*

- 1 - Carrito
  - 1 - Cuchillo para deshuesar
  - 1 - Gancho
  - 1 - Guante resistente a cortes
  - 1 - Clip
  - 1 - Plantilla de corte de muestra USDA Blue N60 (1 pulgada de ancho por 3 pulgadas de largo y 1/8 de pulgada)
- \* el kit también incluye los suministros enumerados en el kit básico de suministro de muestras



Kit N 60



Suministros adicionales

#### Suministros adicionales

- Chaira
- Campo estéril
- Cuchillo para deshuesar curvo
- Pinzas

#### Al recibir los suministros de muestreo:

1. Verifique la recepción de todos los suministros necesarios para realizar la recolección de muestras.
2. Retire los paquetes de gel refrigerante del contenedor de envío y colóquelos en el congelador al menos 24 h antes de la recolección de la muestra. Enfrie previamente el contenedor de envío.

#### El día de la toma de muestra:

1. Encuentre una estación de trabajo adecuada cerca del área de producción para colocar su equipo.
  2. Limpie y desinfecte su estación de trabajo y su organizador y déjelos secar al aire.
- Si no hay disponible una superficie desinfectable cerca del área donde se realizará la recolección de muestras, use el paño de plástico estéril para crear una superficie de trabajo para su equipo de muestreo desinfectado.
3. Desinfecte el cuchillo, la chaira y el gancho. Permita que se sequen al aire.



### ANEXO 3. TOMA DE MUESTRAS UTILIZANDO EL MÉTODO N 60 PARA CARNE CONGELADA (MT51)

#### El día de la toma de muestra:

4. Seleccionar el número de envases de producto congelado del mismo lote. Los contenedores seleccionados deben tener todos el mismo código de producción o fecha. Si está disponible, seleccione al azar cinco (5) contenedores para muestrear.

Llevar los envases de producto congelado al área donde se realizará la toma de muestra.



5. Retire el bloque de producto congelado de su contenedor y colóquelo en el área designada para la toma de muestras.

Si no es posible sacar el producto congelado de su contenedor (como un contenedor combinado lleno de producto congelado), entonces el contenedor debe organizarse para exponer la superficie superior del bloque congelado.



6. Lávese y séquese las manos.



7. Abra las bolsas enrollables estériles. Para abrir, retire la tira desprendible de la parte superior, sujeté las dos pequeñas pestañas blancas y sepárelas. No toque la superficie interior de la bolsa.

8. Coloque la bolsa enrollable cerca del área donde tomará las muestras. La bolsa tiene un fondo reforzado para que, una vez que se agregue el producto, se mantenga en posición vertical.

9. Póngase el guante resistente a los cortes en la mano que no usa el cuchillo y póngase los guantes estériles.



**ANEXO 3. TOMA DE MUESTRAS UTILIZANDO EL MÉTODO N 60 PARA CARNE CONGELADA (MT51)**

10. Recoja asépticamente las muestras usando el gancho y el cuchillo desinfectados. Corte una rebanada de la superficie de aproximadamente 1 pulgada de ancho por 3 a 4 pulgadas de largo por 1/8 de pulgada de grosor. Recuerde concentrarse en cortes finos del tejido de la superficie externa.

NOTA: Es importante mantener las tiras muy delgadas y que presenten la mayor superficie externa posible.

Asegúrese de que las muestras contengan algo de carne porque si toda la muestra es grasa, la grasa puede interferir con el análisis de la muestra.

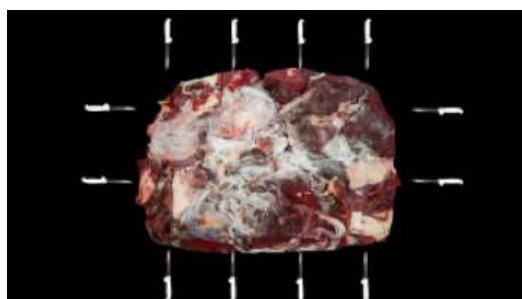


11. Recoja la cantidad adecuada de muestras de cada bloque congelado según la cantidad de contenedores disponibles del lote específico.

De cada uno de los 5 contenedores, tome muestras de 12 lugares distribuidos uniformemente alrededor de la superficie del bloque congelado.

Tome muestras de la mayor cantidad posible de la superficie.

El diagrama muestra cómo recolectar una muestra en cada punto de 30 grados de la superficie de todo el bloque congelado.



12. Mantenga las rebanadas muy delgadas y asegúrese de que las muestras contengan algo de carne y no sean solo tejido graso.

NOTA: La grasa puede interferir con el análisis de la muestra.



La foto muestra el tamaño de muestra correcto para cada pieza N60 en comparación con la plantilla.



**ANEXO 3. TOMA DE MUESTRAS UTILIZANDO EL MÉTODO N 60 PARA CARNE CONGELADA (MT51)**

<p>13. Coloque cada rebanada en una de las bolsas enrollables estériles. Continúe este proceso hasta que haya reunido 30 piezas en una bolsa con cierre enrollable.</p> <p>14. Repita los pasos 10 a 13 hasta que haya recolectado dos bolsas con cierre enrollable, cada una con 30 rebanadas.</p> <p>NOTA: Cuando se corta al tamaño correcto, 30 rebanadas de muestra deben llenar una bolsa con cierre enrollable hasta la línea de llenado.</p>	
<p>15. En la tercera bolsa estéril con cierre enrollable, recolecte asépticamente muestras de recortes del mismo lote de producción. No es necesario cortar las piezas a una determinada dimensión. Recoge piezas con la mayor superficie externa posible.</p> <p>Para piezas de cortes más grandes, corte la pieza para que quepa en la bolsa de muestra, pero asegúrese de dejar al menos 2-3 pulgadas de espacio en la parte superior de la bolsa y expulse la mayor cantidad de aire de la bolsa antes de cerrarla.</p>	
<p>16. Una vez que se complete la recolección de la muestra, expulse con cuidado el exceso de aire de la bolsa de la muestra, dóblela firmemente sobre la parte superior al menos tres veces y luego doble las lengüetas laterales para asegurar los pliegues en su lugar.</p> <p>No ate los extremos.</p>	

# CAPÍTULO VI

## MÉTODOS RÁPIDOS EN MICROBIOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

*Rodrigo Burgos<sup>1</sup> y Juan Martín Oteiza<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>. SGS Argentina.

<sup>2</sup>. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET);  
Laboratorio de Microbiología de los Alimentos,  
Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI),  
Centenario, Neuquén, Argentina.

La evolución de los métodos rápidos en microbiología comenzó en la década de 1960 con análisis clínicos. En el contexto de los alimentos, estos métodos se adoptaron una década después de su introducción en la microbiología clínica, aunque su desarrollo inicial fue más gradual. Sin embargo, en los últimos años, fuimos testigos de sustanciales avances.

En la evolución de los métodos rápidos podemos identificar varios hitos:

- Durante el período 1965 a 1975, se produjo el desarrollo de sistemas de miniaturización de las técnicas microbiológicas convencionales, así como la aparición de los primeros kits de diagnóstico. Las pruebas bioquímicas miniaturizadas simplificaron y agilizaron la identificación de microorganismos.

- Entre los años 1975 y 1985, las técnicas inmunológicas experimentaron un rápido crecimiento. La producción de anticuerpos monoclonales posibilitó el desarrollo de ensayos de identificación microbiana basados, tales como ELISA e inmuno Cromatografía.

- De 1985 a 1995, se introdujeron las técnicas genéticas (en particular la reacción en cadena de la polimerasa-PCR), las cuales representaron un punto de inflexión en el análisis microbiológico tanto en el ámbito clínico como en el de alimentos.

- En el Siglo XXI, comenzó el desarrollo de biosensores y *microarrays*, los cuales surgieron como respuesta a las demandas generadas por proyectos como el del genoma humano, así como el avance en proteómica y campos relacionados. Sin embargo, aún no se utilizan en la industria frigorífica bovina.

Este recorrido histórico refleja la constante evolución y la adopción de tecnologías más rápidas y avanzadas en el análisis microbiológico de alimentos.

**Método rápido** es cualquier procedimiento destinado a la detección, el recuento, la caracterización y/o subtipificación de microorganismos. Lo que distingue a estos métodos es su capacidad para proporcionar resultados de manera sencilla, confiable y en un período de tiempo significativamente menor en comparación con los métodos convencionales. Sin embargo, para la confirmación de algunos resultados, todavía se requiere de una combinación de métodos tradicionales y métodos rápidos. Por ejemplo, para la confirmación STEC se requiere la obtención de un cultivo puro, que actualmente se realiza por un método tradicional (placa de Petri con agar), mientras que para la detección y caracterización se suelen utilizar métodos rápidos (como por ejemplo la PCR).

El desarrollo de métodos rápidos y automatizados en el campo de la microbiología aplicada experimentó un crecimiento sustancial en los últimos 25 años, adquiriendo una relevancia destacada tanto en la investigación científica como en la industria alimentaria. Estos avances brindan herramientas innovadoras que mejoran la verificación de los procesos de producción de los alimentos.

Los métodos rápidos se basan en diversos principios físico-químicos, bioquímicos, inmunológicos y moleculares. Como ejemplos de métodos rápidos aplicados a la industria cárnica se incluyen:

- Medios de cultivo deshidratados.
- Métodos basados en sustrato definido (incluyendo medios de cultivo cromogénicos y fluorogénicos).
- Métodos automatizados para determinar el Número más Probable (NMP).
- Métodos inmunológicos como ELISA, inmuno Cromatografía, inmunofluorescencia e inmunocaptura.

- Métodos basados en la detección de ATP.
- PCR en tiempo real (incluyendo qPCR) o digital.
- Amplificación isotérmica (LAMP).
- Galerías miniaturizadas automatizadas y no automatizadas.
- Espectroscopia (FTIR) y espectrometría de masas (MALDI-TOF).
- Ribotipificación.
- Técnicas de secuenciación masiva de ADN.

### **Variables que definen a un método rápido.**

El análisis microbiológico de alimentos evolucionó significativamente en las últimas décadas, con un enfoque creciente en la rapidez y la automatización. Los métodos empleados deben cumplir con una serie de requisitos esenciales, los cuales pueden resumirse en los siguientes aspectos:

- **Exactitud** en la obtención de resultados, incluyendo sensibilidad, límites de detección mínimos, especificidad del sistema de análisis, versatilidad, aplicabilidad potencial y comparación con métodos de referencia.

- **Rapidez**, medido por el tiempo requerido para obtener resultados y el número de muestras que pueden procesarse por hora y por día.

- **Costos mínimos**, que abarcan los gastos iniciales, los costos por análisis y el costo operativo total.

- **Aceptabilidad** por parte de la comunidad científica, la industria, y las agencias reguladoras.

- **Sencillez** de manejo, incluyendo la preparación de muestras, la operación de equipos analíticos y el procesamiento de datos.

- **Cualificación** y formación del personal adecuada para realizar las técnicas.

- **Facilidad** de preparación, estabilidad y disponibilidad de reactivos.
- **Fiabilidad** del método respaldada por la empresa u organismo responsable de la técnica analítica.
- **Soporte técnico** adecuado, que abarca la rapidez, la disponibilidad y el costo de asistencia técnica.
- **Espacio mínimo** para optimizar su implementación en laboratorios de plantas elaboradoras de alimentos.

En el ámbito de la microbiología de alimentos, es crucial comprender ciertas limitaciones que suelen presentar los métodos tradicionales, como los establecidos por la Organización Internacional de Normalización (ISO), el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y el Manual Bacteriológico de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA-BAM). Estos enfoques convencionales, si bien son confiables, a menudo no permiten tomar decisiones con la rapidez necesaria, lo que podría dar aumentos en los costos asociados con la producción de alimentos antes de su liberación al mercado. Debido a esto, surge la necesidad de explorar el empleo de métodos alternativos en microbiología. Los métodos rápidos están diseñados para el análisis eficiente y ágil tanto de materia prima como de productos intermedios y terminados, ambiente, aire y agua, entre otros. Existen métodos rápidos tanto para la detección de microorganismos patógenos, alérgenos, toxinas, proteínas, OGM, como para el recuento de indicadores y alterantes en diversas matrices. La adopción de este tipo de métodos conlleva una serie de ventajas significativas, ya que, entre otras, permiten una verificación más efectiva del proceso de producción y la toma de decisiones a corto plazo. Asimismo, brindan la capacidad de identificar problemas potenciales en las muestras de forma rápida y confiable, lo que es esencial para garantizar la calidad e inocuidad de los alimentos.

## **La revolución de los métodos rápidos en microbiología de alimentos: eficiencia, economía y cumplimiento normativo.**

El crecimiento exponencial de los métodos rápidos disponibles en microbiología de alimentos se refleja en la amplia gama de equipos, y marcas comerciales, disponibles en la actualidad los cuales están diseñados con la finalidad de proporcionar resultados rápidos, en tiempo real, con un alto grado de precisión y a un costo accesible. Un ejemplo concreto de su impacto lo constituye la automatización de los estudios de genotipos bacterianos, la cual transformó un proceso que resultaba tedioso y lento, en un método práctico y aplicable en los análisis microbiológicos de rutina aún en los laboratorios de plantas frigoríficas.

La capacidad de obtener resultados confiables de manera más eficiente y económica redefinió la calidad y seguridad de los análisis en planta. En este contexto, la adopción de tecnologías emergentes y la comprensión de su funcionamiento son esenciales en un mundo que valora la excelencia y la eficacia en la industria de alimentos.

La adopción de métodos rápidos responde a una serie de factores fundamentales que merecen ser mencionados:

- Respuesta a presiones regulatorias.
- Prácticas modernas de producción.
- Reducción de costos.
- Optimización de recursos.
- Complejidad analítica.

En lo que respecta a las presiones regulatorias, resulta importante destacar que la industria alimentaria está sujeta a rigurosas normativas que velan por garantizar la calidad e inocuidad de los productos. Para cumplir con estos estándares, se requiere el empleo de métodos oficiales de referencia,

recomendados tanto por USDA/FSIS, ISO o FDA-BAM, entre otras. Actualmente, los métodos rápidos son recomendados tanto como técnicas de screening y/o confirmatorias por las mencionadas agencias regulatorias internacionales. En consecuencia, el abanico de opciones en cuanto a métodos rápidos es amplio y diverso. No obstante, es esencial subrayar la importancia de utilizar métodos que se encuentren validados para la matriz de uso ya que esto aumenta la fiabilidad de los resultados obtenidos.

### **Elección de un método rápido.**

La elección del “mejor método rápido” en microbiología de alimentos es una tarea compleja, ya que no existe un enfoque universalmente superior. En lugar de ello, debemos considerar una serie de variables y factores que se adecúen a una aplicación específica.

Entre las variables clave que deben tenerse en cuenta, podemos mencionar:

- **Tipo de alimento:** el método rápido seleccionado debe ser compatible con el tipo de alimento que produce la empresa que planea implementarlo. Diferentes alimentos pueden requerir enfoques específicos.
- **Capacitación de los analistas:** la formación del personal es crucial para garantizar la correcta aplicación del método rápido.
- **Decisión de la empresa (costos):** la elección del método rápido también está influenciada por consideraciones económicas. Es necesario evaluar los costos asociados con la adopción y el mantenimiento del método.
- **Cantidad de análisis diarios:** la capacidad del método para procesar una cierta cantidad de muestras por día es un factor importante.
- **Equipamiento adicional:** algunos métodos pueden requerir equipos específicos. Esta inversión en equipos adicionales también debe considerarse.

**- Tiempo de respuesta:** el tiempo que lleva obtener resultados mediante el método rápido es esencial para la toma de decisiones y debe estar en línea con los requisitos de la empresa.

**- Complejidad del análisis:** la complejidad de la técnica y los procedimientos involucrados deben ser adecuados para el personal y los recursos disponibles en el laboratorio.

En consecuencia, se recomienda llevar a cabo análisis comparativos entre varios métodos rápidos para asegurar la elección del enfoque más apropiado.

A nivel industrial, no se tolera un método rápido que arroje resultados falsos negativos, ya que la liberación de un lote de alimentos contaminado con un patógeno, con potencialidad para causar un brote de ETA, puede tener consecuencias graves en la salud pública y afectar la reputación de la empresa elaboradora del alimento implicado. Estas consecuencias conllevan considerables pérdidas económicas y de imagen.

Un resultado falso positivo también implica pérdidas económicas para la empresa (retener alimentos refrigerado o congelado), aunque es un escenario menos grave, ya que puede confirmarse el resultado en corto plazo.

Para estar seguros de que el método es confiable es requisito fundamental que esté respaldado por un certificado o comprobante de validación. Este documento debe detallar todos los parámetros que se evaluaron durante el proceso de validación. Además, es crucial realizar una verificación o familiarización en el laboratorio donde se implementará el método rápido antes de su uso real para verificar que el método funciona según las especificaciones establecidas por el fabricante.

La validación de un método implica confirmar su capacidad para generar resultados comparables con un método de referencia aceptado, como los estándares de ISO, BAM, ICMSF, APHA y otros. La validación de un método rápido es realizada por una tercera parte independiente del laboratorio y del fabricante. Por ejemplo: AOAC International, AFNOR-Francia, NordVal-Países Nómicos, MicroVal-Unión Europea y Health Protection Branco-Canadá. La AOAC es particularmente relevante, ya que validó un amplio número de métodos, siendo su validación reconocida tanto en USA y UE, como en todo el mundo. Cabe destacar que cada organismo posee su propio protocolo de validación. En 2003, como parte de una iniciativa de la UE, se publicó un protocolo internacional de validación (ISO 16140:2003/Amd 2011) para garantizar la uniformidad en la validación de métodos en todo el mundo. Actualmente dicha norma consta de 7 partes (ISO 16140-1:2016; ISO 16140-2:2016/DAmd 1; ISO 16140-3:2021; ISO 16140-4:2020/DAmd 1; ISO 16140-5:2020 y ISO 16140-6:2019; ISO 16140-7:2023) dedicadas a diferentes temas relacionados a validación y verificación de ensayos.

En un certificado de validación se debe verificar información de interés la cual permitirá la utilización del método rápido apropiado a los fines pretendidos:

- Compatibilidad con las matrices alimentarias o no alimentarias (entorno) para las que fue diseñado y validado.
- Información detallada sobre los caldos de enriquecimiento y equipos utilizados en la validación.
- Instrucciones de uso. Se debe respetar rigurosamente el protocolo de uso de los métodos rápidos, ya que cualquier modificación puede afectar los resultados. Si se considera una modificación, es necesario consultar al proveedor para evaluar su viabilidad.

En una visión futurista que nos sitúa en el año 2000, el Dr. Daniel Fung, una eminencia en el ámbito de los métodos rápidos aplicados a la microbiología de alimentos, planteó un panorama que aún hoy nos asombra. En sus predicciones, destacó varios aspectos clave:

**1. La imposibilidad de reemplazar el recuento de microorganismos viables.**

Si bien existen métodos genómicos para detectar microorganismos no cultivables, todos los recuentos realizados de rutina en la industria de los alimentos se basan en microorganismos viables.

**2. La supervisión de la higiene en tiempo real a través de métodos rápidos.**

Desde hace décadas se utilizan métodos de lectura *in situ* para verificar POES, entre ellos métodos colorimétricos y de bioluminiscencia (ATP).

**3. La generalización de las técnicas genotípicas en los laboratorios de alimentos.**

En Argentina, en desde el año 2010, los frigoríficos exportadores utilizan PCR en tiempo real para la detección de microorganismos patógenos.

**4. La automatización de las pruebas inmunológicas.**

Actualmente, existen diversos sistemas automatizados de detección e inmunoconcentración de bacterias patógenas basados en innovadores desarrollos inmunológicos.

**5. La obtención de resultados más rápidos mediante la inmuno Cromatografía.**

Esta técnica permite detectar y semicuantificar toxinas, proteínas y OGM en un par de min. Sin embargo, para la detección de bacterias patógenas se debe considerar el período de enriquecimiento (ver capítulo VIII de este manual).

**6. La integración de biosensores en los programas APPCC.**

Esta predicción aún no se utiliza en la industria frigorífica, aunque son numerosos los desarrollos orientados a la industria de alimentos líquidos (productos lácteos, por ejemplo).

**7. La detección instantánea de patógenos a través de sistemas computarizados.** Refiere a biosensores en la línea de producción. Aún no utilizados en la industria frigorífica.

**8. La implementación de métodos eficaces para la separación y concentración de bacterias buscadas.** Aplicados de rutina en varios frigoríficos bovinos del país.

**9. La utilización de sistemas de alerta microbiológica en los envases de alimentos.** Actualmente existen métodos rápidos aplicados a los envases. En Argentina los más habituales son aquellos que refieren al monitoreo de la temperatura del producto.

**10. La disponibilidad de dispositivos de alerta rápida para que los consumidores puedan detectar patógenos en sus hogares.** Existen varios desarrollos que se utilizan en otros países y se basan en métodos inmunológicos. En Argentina no están disponibles aún.

Es de esperar que con el correr de los años y con el avance de la ciencia y la tecnología todas las predicciones del Dr. Fung terminen concretándose.

**Desafíos actuales de los métodos rápidos en microbiología de alimentos:**

- Costo de implementación y accesibilidad:** los equipos y reactivos para los métodos rápidos a menudo son más costosos que los utilizados en los métodos tradicionales, lo que puede ser un obstáculo para las pequeñas empresas o laboratorios con presupuestos limitados. Estas tecnologías deben ser accesibles para una variedad de industrias y operaciones, incluidas las pequeñas y medianas empresas, es esencial para verificar los procesos de producción de alimentos a nivel global.

- Capacitación del personal:** la operación y la interpretación de resultados de los métodos rápidos requieren habilidades técni-

cas específicas. Capacitar al personal para utilizar estas tecnologías de manera efectiva resulta esencial, pero puede llevar tiempo y recursos significativos.

• **Validación y estandarización:** es fundamental validar y estandarizar los métodos rápidos para asegurar la precisión y la confiabilidad de los resultados. La falta de estándares y protocolos universalmente aceptados puede ser un desafío en la implementación y comparación de datos entre diferentes laboratorios.

• **Interferencias y matrices de muestra:** algunas matrices de alimentos pueden contener sustancias que interfieren con los métodos rápidos, lo que puede conducir a resultados incorrectos o imprecisos. Es crucial abordar estas interferencias para garantizar la fiabilidad de las pruebas.

• **Integración con sistemas de producción:** integrar sistemas de detección en línea con los procesos de producción de alimentos es un desafío importante. Los sistemas deben ser capaces de adaptarse a entornos de producción variables y complejos, asegurando una detección continua sin interrumpir las operaciones.

• **Seguridad de los datos:** la transmisión y almacenamiento de datos en tiempo real plantean preocupaciones sobre la seguridad de la información. Es crucial garantizar que los datos de detección en línea estén protegidos contra posibles amenazas ciberneticas y accesos no autorizados para mantener la integridad de los resultados.

### **Futuro de los métodos rápidos en microbiología de alimentos:**

1. **Integración de tecnologías emergentes:** se espera una mayor integración de tecnologías emergentes como la inteligencia artificial y el aprendizaje automático para mejorar la interpretación de datos y hacer que los métodos rápidos sean más eficientes y precisos en la identificación y cuantificación de microorganismos en los alimentos.

2. **Desarrollo de sensores portátiles y dispositivos miniaturizados:** la miniaturización de los dispositivos y el desarrollo de sensores portátiles permitirán realizar pruebas *in situ* de manera rápida y económica, lo que será especialmente útil en entornos donde el acceso a laboratorios especializados es limitado.

3. **Enfoques multiplex y omics:** los métodos rápidos multiplex permitirán la detección simultánea de varios patógenos en una sola muestra, lo que aumentará la eficiencia y reducirá el tiempo de análisis. Además, las tecnologías 'omics', como la genómica, la proteómica y la metabolómica, se utilizarán para comprender mejor las interacciones entre los microorganismos y los alimentos, lo que mejorará la capacidad de detección y prevención.

4. **Avances en nanotecnología:** la nanotecnología se utilizará para desarrollar biosensores y plataformas de detección ultrasensibles que pueden identificar incluso concentraciones muy bajas de microorganismos patógenos en los alimentos.

5. **Sostenibilidad:** se esperan avances en métodos rápidos que sean respetuosos con el medio ambiente, utilizando tecnologías y reactivos sostenibles de manera de minimizar el impacto ambiental de las pruebas microbiológicas en la industria alimentaria.

Estos avances y enfoques están destinados a superar los desafíos actuales y mejorar la eficacia, precisión y accesibilidad de los métodos rápidos en microbiología de alimentos, los cuales deberán complementarse y adecuarse a la tecnologías alimentarias del futuro.

## **Tendencias decisivas en tecnologías alimentarias del futuro.**

En el ámbito del diagnóstico *in vitro* de análisis de matrices alimentarias, es crucial comprender las áreas que predominarán en la próxima década. A continuación, se detallan las tendencias más destacadas que deberán satisfacer las tecnologías involucradas:

- **Tecnologías de procesamiento avanzadas:** la aplicación de técnicas innovadoras, como la alta presión, pulsos eléctricos y ultrasonido, se posiciona como una vanguardia para mejorar la eficiencia en el procesamiento de alimentos, manteniendo al mismo tiempo la calidad nutricional.

- **Blockchain en la cadena de suministro de alimentos:** la utilización de la tecnología blockchain emerge como una herramienta fundamental para mejorar la transparencia y trazabilidad en la cadena de suministro alimentaria. Esto posibilita a los consumidores rastrear el origen y la calidad de los alimentos, asegurando una mayor confianza en los productos.

- **Alimentos personalizados y tecnología de nutrición personal:** la evolución hacia alimentos personalizados, adaptados a las necesidades nutricionales individuales, se potencia mediante el uso de tecnologías como la inteligencia artificial. Esto implica un análisis más preciso de datos de salud y preferencias personales para ofrecer productos alimenticios más acordes con las demandas de los consumidores.

- **Impresión 3D de alimentos:** los avances en la impresión 3D juegan un papel crucial en la creación de alimentos personalizados, especialmente en entornos de atención médica. Esta tecnología también contribuye a la producción de alimentos visualmente atractivos, demostrando ser una herramienta versátil y revolucionaria.

- **Tecnologías de conservación de alimentos:** el desarrollo continuo de métodos de conservación innovadores, como la apli-

cación de nanotecnología, se erige como un pilar para prolongar la vida útil de los alimentos de manera segura, garantizando al mismo tiempo su integridad y calidad.

- **Alimentos funcionales y enriquecidos:** existe un enfoque creciente en el desarrollo de alimentos con beneficios específicos para la salud, incorporando ingredientes funcionales como probióticos, prebióticos y otros. Este campo promete aportar soluciones nutricionales más efectivas y adaptadas a las necesidades individuales.

- **Sostenibilidad en el desarrollo de alimentos:** la atención a prácticas sostenibles en la producción de alimentos se intensifica, abarcando desde la reducción de desperdicios hasta el uso eficiente de recursos. La búsqueda de alternativas sostenibles se convierte en un imperativo para la industria alimentaria.

- **Tecnologías de etiquetado inteligente:** el desarrollo de etiquetas inteligentes y códigos QR se perfila como un medio eficaz para proporcionar a los consumidores información detallada sobre la procedencia y características de los alimentos, contribuyendo a una mayor transparencia en la industria.

# **CAPÍTULO VII**

## **RECUENTO DE MICROORGANISMOS INDICADORES**

*Pablo Escobar<sup>1</sup>, Karen Giselle Beltrán Orellana<sup>1</sup>  
y Jessica Babich<sup>2</sup>*

*1.* Laboratorio Compañía Bernal S.A. Laboratorio del establecimiento frigorífico 2062. Bernal Oeste, Argentina.

*2.* Departamento de Microbiología de los Alimentos, Coordinación de Calidad e Inocuidad de Alimentos de Origen Animal, DLA-DGLyCT, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa), Martínez, Buenos Aires, Argentina.

En la industria alimentaria se efectúan procesos de elaboración bajo estrictos sistemas de aseguramiento de la calidad, tales como planes de APPCC, que permiten otorgar garantías sobre los productos elaborados. Además, desde 1998 se implementan normas voluntarias de seguridad alimentaria; por ejemplo, la Norma BRCGS. Estas normas son actualizadas periódicamente con el objeto de reflejar los últimos desarrollos en materia de inocuidad alimentaria y fomentar su adopción en todo el mundo. Dicha norma proporciona un sistema de trabajo o guía que ayuda a los fabricantes a producir alimentos seguros, auténticos y legales, y gestionar su calidad para satisfacer los requisitos de los clientes.

Los procesos de producción requieren de verificaciones, entre las que se incluyen los análisis microbiológicos. El análisis microbiológico de los alimentos se basa en estándares establecidos por los comités reguladores de seguridad de productos específicos.

La tendencia actual es establecer requisitos de calidad cada vez más estrictos que garanticen la inocuidad alimentaria. Los laboratorios deben proporcionar resultados rápidos, confiables y precisos.

En este capítulo abordaremos los siguientes temas:

- A. Microorganismos indicadores en la industria frigorífica.
- B. Preparación y siembra de muestras para recuentos de indicadores.
- C. Metodologías para recuento de indicadores (métodos tradicionales y métodos rápidos).
- D. Análisis y expresión de resultados obtenidos en medios sólidos (aplica a métodos tradicionales y a métodos rápidos).
- E. Control de calidad.

## A. MICROORGANISMOS INDICADORES EN LA INDUSTRIA FRIGORÍFICA

### Bacterias aerobias mesófilas

Las bacterias aerobias mesófilas (BAM) se definen como un grupo heterogéneo de bacterias capaces de crecer en un rango de temperaturas de 15 a 45°C, con un óptimo de 35°C. El recuento de BAM proporciona información sobre la población microbiana total (bacterias, hongos filamentosos y levaduras) capaces de desarrollar bajo las condiciones establecidas. Estos microorganismos se encuentran en una amplia variedad de alimentos, incluyendo la carne y los productos cárnicos. El recuento de BAM se utiliza para evaluar la higiene del proceso de producción, desde la materia prima hasta el producto final, y para identificar cualquier posible contaminación. Nos permite verificar la efectividad de la limpieza y desinfección, determinar si las temperaturas aplicadas a los procesos fueron las adecuadas (productos cárnicos cocidos), determinar el origen de la contaminación durante los procesos, verificar las condiciones óptimas de almacenamiento y transporte, entre otras.

Las BAM representan la cantidad total de microorganismos aerobios mesófilos viables presentes en un alimento, y su recuento puede proporcionar información sobre la calidad y frescura del producto. Los recuentos elevados pueden ser un indicador de una mala higiene en la producción o del almacenamiento prolongado del producto.

En la industria cárnica, el recuento de BAM se utiliza en varias etapas del proceso de producción: materia prima, producto en proceso y producto final. También se utiliza como un indicador de vida útil, ya que el número de bacterias presentes puede aumentar durante el almacenamiento, reduciendo y/o modificando la calidad del producto. De esta manera, el recuento de BAM es uno de los análisis utilizados para determinar la

fecha de caducidad y estimar la calidad del producto.

El recuento de BAM no puede utilizarse como indicador de seguridad para los microorganismos de deterioro o patógenos, porque no existe correlación entre los recuentos y la presencia de patógenos. Un recuento total bajo no implica la ausencia de deterioro o patógenos. Del mismo modo, un recuento total elevado no implica la presencia de microorganismos alterantes (productos cárnicos envasados al vacío) o microorganismos patógenos.

## Enterobacterias

Las Enterobacterias son un grupo de bacterias gram-negativas que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Se pueden encontrar en suelo, agua, alimentos y trato gastrointestinal de humanos y animales. Estas bacterias son conocidas por su diversidad y adaptabilidad, así como por su capacidad para causar enfermedades.

Son un grupo de microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza y en el ambiente industrial. En la industria cárnica pueden estar presentes en materias primas, insumos e ingredientes, equipos de producción, ambiente y trabajadores. La búsqueda de Enterobacterias sirve para el mismo propósito que las pruebas de coliformes, ya que proporcionan evidencia de falta de higiene, procesos inadecuados y/o contaminación pos-proceso. A menudo, estos microorganismos indicadores son elegidos por ser relativamente rápidos y fáciles de detectar.

Las Enterobacterias se caracterizan por tener mayor resistencia al medio ambiente que los coliformes.

La familia *Enterobacteriaceae* incluye bacilos anaerobios facultativos con necesidades nutricionales sencillas. Las propiedades metabólicas de esta familia bacte-

riana son muy útiles para caracterizar sus géneros constituyentes. Las Enterobacterias degradan glucosa mediante la ruta de Embden-Meyerhof y escinden el ácido pirúvico en un proceso que se conoce como fermentación ácido fórmica. El ácido fórmico, por acción de una enzima, se convierte en  $H_2$  y  $CO_2$ . Las Enterobacterias producen grandes cantidades de gas durante la fermentación del azúcar, como las especies de *Escherichia*, que degradan el ácido fórmico a  $H_2$  y  $CO_2$ .

Esta familia puede dividirse en dos grupos, en función de sus productos de fermentación:

1. Fermentación ácido-mixta: se producen principalmente lactato, acetato, succinato, formiato y etanol. Por ejemplo: *Escherichia*, *Salmonella*, y *Proteus*, entre otros.

2. Fermentación butanodiólica: los productos principales son butanodiol, etanol y  $CO_2$ . Por ejemplo: *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*.

Para identificarlas se utilizan pruebas bioquímicas luego de un examen preliminar de su morfología, movilidad y crecimiento. Las pruebas utilizadas para evidenciar el metabolismo de las Enterobacterias son: utilización de hidratos de carbono, actividad de o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranósido (ONPG), producción de indol, rojo de metilo, pruebas de Voges-Proskauer, utilización de citrato, producción de ureasa, descarboxilación de la lisina, arginina y ornitina, producción de fenil-alanina desaminasa, producción de  $SH_2$  y movilidad.

Varios géneros bacterianos se encuentran dentro de esta familia; entre ellos *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Cronobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Hafnia*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* y *Yersinia*.

A su vez, esta familia se divide en géneros que fermentan y no fermentan la lactosa.

- No fermentadores de lactosa: *Salmonella*, *Shigella*, *Erwinia*, *Providencia* y *Cronobacter*.

- Fermentadores de Lactosa (coliformes): *Escherichia*, *Klebsiella* (excepto *K. rhinoscleromatis*), *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Edwardsiella*, *Morganella* y *Yersinia*.

## Coliformes Totales

Los coliformes son un grupo de bacterias gram-negativas, no formadoras de esporas, fáciles de cultivar e identificar, que se definen por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y/o dióxido de carbono gaseoso. Si bien, solo una fracción de los coliformes son de origen fecal (la mayoría son contaminantes ambientales), se utilizan como indicadores de contaminación fecal en ambiente, agua y alimentos. Algunas especies de coliformes pueden ser patógenas y causar enfermedades en humanos y animales. A pesar de que no existe una relación directa entre los recuentos de coliformes y la presencia de microorganismos patógenos o alterantes, un valor elevado de coliformes totales en el ambiente de producción puede, en ocasiones, desencadenar pruebas adicionales de búsqueda de patógenos. En general, las pruebas de coliformes se utilizan en combinación con otras pruebas de indicadores (como microorganismos aerobios mesófilos) de manera de validar o verificar los procedimientos y protocolos de saneamiento.

Este grupo de microorganismos comprende algunos géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, capaces de fermentar la lactosa a 35°C con producción de ácido y gas. Los alimentos pueden contaminarse con coliformes durante la producción, procesamiento, transporte y almacenamiento. Las fuentes de contaminación pueden incluir agua, tierra, animales y manipuladores de alimentos.

Entre los coliformes se pueden distinguir dos tipos:

- **Coliformes fecales**, provienen del tracto intestinal de animales de sangre caliente y que serían los mejores indicadores de riesgo de afecciones humanas.

- **Coliformes totales**, son residentes naturales de ambiente y agua. Si bien esta clasificación continúa siendo utilizada en reglamentaciones, se considera en proceso de revisión, ya que el método de diferenciación de ambas categorías no sería concluyente.

## *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un bacilo gram-negativo y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son microorganismos no esporulados y con flagelos períticos en el caso de ser móviles. Los cultivos son anaerobios facultativos, citocromo oxidasa negativos y sensibles al cianuro potásico, reducen los nitratos a nitritos. El crecimiento a partir de pequeños inóculos se inicia a intervalos de pH entre 4,4 y 8,8, a un rango biocinético de 9-44°C y en gradientes salinos de 0- 0,65%. Fermenta una gran variedad de azúcares, tales como arabinosa, lactosa, manitol, glucosa y xilosa, produciendo una mezcla de ácidos, etanol, CO<sub>2</sub> e hidrógeno.

Las cepas de *E. coli* se pueden agrupar de acuerdo con sus órganos blanco en: 1) diarreogénicas (DEC, por sus siglas en inglés diarrheagenic *E. coli*), asociadas a infecciones gastrointestinales; y 2) extra-intestinales (ExPEC, extra-intestinal *E. coli*), causantes de infecciones urinarias, septicemia y meningitis. Las DEC se clasifican según sus manifestaciones clínicas, patogenicidad y características epidemiológicas en:

- *E. coli* enteropatógeno (EPEC, enteropathogenic *E. coli*).

- *E. coli* enterotoxigénico (ETEC, enterotoxigenic *E. coli*).

- *E. coli* enterohemorrágico (EHEC, entero-hemorrhagic *E. coli*)
- *E. coli* enteroinvasivo (EIEC, enteroinvasive *E. coli*).
- *E. coli* enteroagregativo (EAEC, enteroaggregative *E. coli*).
- *E. coli* de adherencia difusa (DAEC, diffuse-adherent *E. coli*).

El hábitat natural de *E. coli* es el intestino de los animales vertebrados. Los criterios microbiológicos que incluyen *E. coli* son de utilidad en casos en que se deseé determinar contaminación fecal. La contaminación de un alimento con *E. coli*, implica el riesgo de que puedan encontrarse en el mismo, patógenos entéricos que constituyan un riesgo para la salud. Sin embargo, la ausencia de *E. coli* no significa que otros patógenos entéricos no estén presentes.

En productos y subproductos cárnicos crudos es posible encontrar recuentos de *E. coli*, como consecuencia del proceso de faena y producción. Si el objetivo del análisis es verificar la contaminación de estos alimentos el indicador bacteriano a analizar es *E. coli*. En estos casos se puede referir como *E. coli* genérico.

En productos cárnicos cocidos *E. coli* se puede eliminar o reducir mediante procesos térmicos. La presencia de este microorganismo en un alimento sometido a temperaturas elevadas significa un proceso deficiente o una contaminación posterior al proceso (equipo, manipuladores o contaminación cruzada). Si el objetivo del análisis es verificar la contaminación pos-tratamiento térmico, los indicadores bacterianos a analizar son los coliformes.

### ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* es una bacteria gram-positiva y de forma esférica, pertene-

ciente a la familia *Staphylococcaceae*. Se dispone en grupos irregulares o racimos.

Esta bacteria es un patógeno humano y animal que puede causar una amplia gama de afecciones, desde infecciones leves de la piel hasta cuadros sistémicos graves. Es parte de la flora bacteriana normal de la piel y las mucosas del hombre y los animales. Aproximadamente el 20-30% de las personas son portadoras colonizadas de forma transitoria o permanente de esta bacteria en su nariz o piel. La transmisión puede ocurrir a través del contacto directo de persona a persona, así como a través de objetos contaminados.

*S. aureus* produce una amplia variedad de factores de virulencia que le permiten colonizar, invadir y causar daño en los tejidos del huésped. Además, tiene capacidad para desarrollar resistencia a múltiples antibióticos. Los mecanismos de virulencia más destacados son:

- **Enterotoxinas:** causantes de intoxicación alimentaria. Son toxinas preformadas en el alimento que causan vómitos, diarrea y eventual septicemia.

- **Enzima coagulasa:** promueve la formación de coágulos sanguíneos al convertir el fibrinógeno en fibrina, permitiendo que la bacteria se esconda de las defensas del huésped y facilite la formación de abscesos.

La presencia de *S. aureus* en productos cárnicos se interpreta como un indicador de contaminación por manipuladores, animales y/o ambiente de elaboración. El análisis de *S. aureus* tiene especial relevancia en productos y subproductos cárnicos cocidos o listos para el consumo.

### **Hongos filamentosos y levaduras**

Los hongos filamentosos y las levaduras son microorganismos eucariotas.

La mayoría de los hongos filamentosos son pluricelulares y se caracterizan por estar constituidos por filamentos ramificados o hifas que se desarrollan y entrelazan formando el micelio. Existe un micelio vegetativo adosado a la superficie del sustrato (suelo, plantas, alimentos) y un micelio aéreo o reproductor, donde se forman las esporas (sexuales y asexuales).

Las levaduras son hongos unicelulares con forma oval (5-20 µm) inmóviles y que se dividen por diversos mecanismos, especialmente por gemación.

Los hongos filamentosos y levaduras son en su mayoría saprófitos, hallándose en el ambiente, especialmente en la materia orgánica en descomposición. Algunas especies son parásitas, formando parte de la flora normal, como por ejemplo *Candida albicans*, una levadura que puede comportarse como oportunista y resultar patógena. Otras especies de hongos pueden producir micotoxinas durante su desarrollo; por ejemplo, las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*, un hongo filamentoso al cual deben su nombre aunque actualmente se conoce que otras especies de hongos también pueden producir aflatoxinas como también otras clases de micotoxinas.

Algunos hongos son bifásicos, es decir, unas veces se comportan como hongos filamentosos y otras como levaduras.

Los hongos filamentosos y las levaduras crecen más lentamente que las bacterias en los alimentos no ácidos que conservan humedad y por ello pocas veces determinan problemas de deterioro en productos y subproductos cárnicos.

Las condiciones necesarias para que un hongo crezca en superficie son: presencia de esporas, nutrientes, humedad y temperatura (entre 4° y 38°C).

Los hongos filamentosos y las levaduras se diferencian en el laboratorio en dos grupos según el aspecto macroscópico de sus colonias: las levaduras forman colonias húmedas, cremosas, opacas o pastosas, y los hongos filamentosos producen colonias algodonosas, lanosas o pulverulentas.

La identificación de los hongos filamentosos se basa en el examen macroscópico de la colonia y en sus características microscópicas. La identificación definitiva se basa en la forma característica, método de producción y ordenamiento de las esporas, siendo también importante el tamaño y la disposición de las hifas.

Waksman (1922) sugirió el uso de medios acidificados para el recuento de hongos filamentosos del suelo y a partir de la fecha se adoptó esta técnica para el recuento de hongos y levaduras en alimentos. Para inhibir el crecimiento de bacterias en estos medios se utilizaron antibióticos como cloranfenicol, estreptomicina, ciclotetraciclina, oxitetraciclina y gentamicina. La mejor incubación de los cultivos se sitúa alrededor de 22°C y el tiempo de incubación más adecuado es de cinco días. Algunos de los medios de cultivo empleados para el aislamiento de hongos y levaduras son el agar Rosa de bengala y el Agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (YGC).

### Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) juegan un papel crucial en la fermentación láctica de los azúcares presentes en los alimentos y producen ácido láctico, lo que resulta en un descenso del pH y una acidificación del producto. Son microorganismos gram-positivos, aerotolerantes o anaerobias facultativas y son catalasa negativa. Si bien están asociadas con efectos beneficiosos sobre los alimentos, pueden causar problemas si no se controlan adecuadamente. Un crecimiento descontrolado de estas bacterias puede resultar en acidificación excesiva,

textura indeseable, cambios en el color y sabores agrios en los alimentos. Por lo tanto, es fundamental mantener estrictas prácticas de higiene y controlar las condiciones de fermentación para garantizar un producto final de calidad.

### ***Listeria* spp.**

El género *Listeria* está formado por bacilos gram-positivos, no encapsulados ni esporulados y anaerobios facultativos. Actualmente, se conocen más de 20 especies de *Listeria* que se subdividen en dos grandes grupos: *Listeria* sensu stricto, constituida por las especies *monocytogenes*, *innocua*, *welshimeri*, *seeligeri*, *ivanovii* y *marthii*; y *Listeria* sensu lato, constituida por las especies *grayi*, *rocourtiae*, *fleischmannii*, *weihenstephanensis*, *floridensis*, *aquatica*, *cornellensis*, *riparia*, *grandensis*, *booriae*, *newyorkensis*, *costaricensis*, *goaensis* y *thailandensis* (Leclercq et al., 2019).

En cultivos de varios días pueden aparecer formando filamentos de 6-20 mm de longitud. Presentan de 1 a 5 flagelos periticos que les confieren movilidad a 28°C. Las colonias son lisas y pequeñas, de 1 a 2 mm tras uno o dos días de incubación. Su temperatura óptima de crecimiento está entre 30°C y 37°C, pero pueden crecer a 4°C en pocos días. *Listeria* spp. son anaerobios facultativas, catalasa positiva y oxidasa negativa. Las reacciones de Voges-Proskauer y rojo de metilo son positivas. Hidrolizan la esculina en pocas horas, pero no la urea ni la gelatina; no producen indol ni SH<sub>2</sub>. Producen ácido de la D-glucosa y de otros azúcares.

Las especies de *Listeria* están muy extendidas en el medio ambiente. Se aislaron del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, comida animal, carne, verduras, pescado y mariscos, pollo fresco y congelado, alimentos frescos y procesados, lácteos (queso, leche no procesada), desechos de los mataderos, así como en

el tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos. También fueron aisladas de muestras ambientales de plantas de transformación de alimentos.

La identificación de especie es importante particularmente en productos cárnicos cocidos y precocidos. Los miembros del género *Listeria* pueden estar presentes en los alimentos, aunque *L. monocytogenes* es el principal patógeno del género asociado a enfermedades en humanos.

### ***Clostridium* sulfito reductores**

Los anaerobios sulfito-reductores constituyen un grupo asociado a los *Clostridium* spp. y como tal se caracterizan por ser organismos gram-positivos, anaeróbicos, formadores de esporas, que están normalmente en las heces, aunque en número mucho más reducido que *E. coli*.

El origen de los anaerobios sulfito-reductores no es exclusivamente fecal, ya que pueden proceder de otras fuentes como suelo, sedimentos marinos, vegetación en descomposición, heridas infectadas de hombre y animales, aguas superficiales, pero también de alimentos, especialmente cuando las condiciones de higiene en la elaboración son deficientes. Los microorganismos anaerobios sulfito-reductores pueden clasificarse en mesófilos y termófilos.

En el anexo 4 se presentan los criterios microbiológicos que incluyen microorganismos indicadores en productos cárnicos bovinos comparados según destino.

Anexo 4. Criterios microbiológicos que incluyen microorganismos indicadores en productos cárnicos bovinos comparados según destino.

DESTINO	MATRIZ	MICROORGANISMO	PLAN DE MUESTREO		LÍMITES	NORMA	METODOLOGÍA
			n	c			
Argentina	Carne picada fresca	Aerobios Mesófilos (UFC/g)	5	3	$m=10^6$ $M=10^7$	Artículo 255 – CAA (Resolución Conjunta SCS y SAByDR N° 30/2021)	ISO 4833-1 BAM-FDA
		<i>E. coli</i> (UFC/g)	5	2	$m=100$ $M=500$		ISO 16649-2
		Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	5	2	$m=100$ $M=1000$		ISO 6888-1
	Salazones cocidas	Recuento de coliformes (NMP/g)	5	2	$m=10$ $M=100$	Artículo 286 bis - CAA (Resolución Conjunta SPRel N°178/2012 y SAGyP N° 714/2012)	ISO 4831:2001; BAM-FDA:2001; ICMSF
		Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (NMP/g)	5	1	$m=10$ $M=100$		ISO 6888-3:1999; ICMSF
		Recuento de hongos y levaduras (UFC/g)	5	2	$m=100$ $M=1000$		ISO 21527-2:2008; BAMFDA:2001; APHA:2001
		Recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g)	5	1	$m=100$ $M=1000$		ISO 15213:2003
	Salazones crudas	Recuento de coliformes (NMP/g)	5	2	$m=10$ $M=100$	Artículo 286 tris - CAA (Resolución Conjunta SPRel N°178/2012 y SAGyP N° 714/2012)	ISO 4831:2001; BAMFDA:2001; ICMSF
		Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (NMP/g)	5	1	$m=10$ $M=100$		ISO 6888-3:1999; ICMSF
		Recuento de hongos y levaduras (UFC/g)	5	2	$m=100$ $M=1000$		ISO 21527-2:2008; BAMFDA:2001 APHA:2001
		Recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g)	5	1	$m=100$ $M=1000$		ISO 15213:2003
	Chacinados embutidos cocidos	Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	5	2	$m=10^4$ $M=10^5$	Artículo 302 – CAA (Resolución Conjunta SPRel y SAV N° 4 - E/2017)	ISO 4833:2003 BAM-FDA:2001
		Recuento de <i>E. coli</i> (NMP/g)	5	0	$m<3$		ISO 16649-3:2005 ICMSF (método 1) BAM-FDA:2002 (método 1)
		Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	5	1	$m=100$ $M=1000$		ISO 6888- 1:1999 ICMSF
		Recuento de hongos y levaduras (UFC/g)	5	2	$m=100$ $M=1000$		ISO 21527- 2:2008, BAM-FDA:2001, APHA:2001
		Recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g)	5	1	$m=100$ $M=1000$		ISO 15213:2003
	Chacinados embutidos frescos	Recuento de <i>E. coli</i> (NMP/g)	5	2	$m=100$ $M=1000$	Artículo 302 – CAA (Resolución Conjunta SPRel y SAV N° 4 - E/2017)	ISO 16649- 3:2005 ICMSF (método 1) BAM-FDA:2002 (método 1)
		Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	5	2	$m=100$ $M=1000$		ISO 6888- 1:1999 ICMSF
		Recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g)	5	2	$m=100$ $M=1000$		ISO 15213:2003
	Chacinados embutidos secos	Recuento de <i>E. coli</i> (NMP/g)	5	0	$m<3$	Artículo 302 – CAA (Resolución Conjunta SPRel y SAV N° 4 - E/2017)	ISO 16649- 3:2005 ICMSF (método 1) BAM-FDA:2002 (método 1)
		Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	5	1	$m=100$ $M=1000$		ISO 6888- 1:1999 ICMSF
		Recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g)	5	1	$m=100$ $M=1000$		ISO 15213:2003
	Chacinados no embutidos (frescos)	Recuento de <i>E. coli</i> (NMP/g)	5	2	$m=100$ $M=1000$	Artículo 302 – CAA (Resolución Conjunta SPRel y SAV N° 4 - E/2017)	ISO 16649- 3:2005 ICMSF (método 1) BAM-FDA:2002 (método 1)
		Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	5	2	$m=100$ $M=1000$		ISO 6888- 1:1999 ICMSF
		Recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g)	5	2	$m=100$ $M=1000$		ISO 15213:2003

DESTINO	MATRIZ	MICROORGANISMO	PLAN DE MUESTREO		LÍMITES	NORMA	METODOLOGÍA
			n	c			
Argentina	Chacinados no embutidos (secos cocidos)	Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	5	2	$m=10^4$ $M=10^5$	Artículo 302 – CAA (Resolución Conjunta SPReI y SAV N° 4 - E/2017)	ISO 4833:2003 BAM-FDA:2001
		Recuento de <i>E. coli</i> (NMP/g)	5	0	$m<3$		ISO 16649- 3:2005 ICMSF (método1) BAM-FDA:2002 (método 1)
		Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	5	1	$m=100$ $M=1000$		ISO 6888- 1:1999; ICMSF
		Recuento de hongos y levaduras (UFC/g)	5	2	$m=100$ $M=1000$		ISO 21527- 2:2008, BAM-FDA:2001, APHA:2001
		Recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g)	5	1	$m=100$ $M=1000$		ISO 15213:2003
	Pernil	Recuento de coliformes (NMP/g)	5	2	$m=10$ $M=100$	Artículo 293 bis - CAA (Resolución Conjunta RESFC-2018-17- APN-SRYGS#MSYDS N°17/2018)	ISO 4831:2001, BAMFDA:2001, ICMSF
		Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	5	1	$m=10$ $M=100$		ISO 6888-1:1999
		Recuento de hongos y levaduras (UFC/g)	5	2	$m=100$ $M=1000$		ISO 21527- 2:2008; BAM-FDA: 2001, capítulo 18 APHA: 2001
		Recuento de anaerobios sulfito reductores (UFC/g)	5	1	$m=10$ $M=100$		ISO 15213:2003
China	Productos de Carne de Animales y Aves Fresca	Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	-	-	$1\times10^5$	Norma Nacional de la República Popular China GB/T 17238-2008 Reemplaza GB/T 17238-1998	GB-T 4789.2
		Coliformes (NMP/100g)	-	-	$1\times10^4$		GB-T 4789.3
	Productos de Carne de Animales y Aves Congelados	Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	-	-	$5\times10^5$		GB-T 4789.2
		Coliformes (NMP/100g)	-	-	$1\times10^3$		GB-T 4789.3
		Carne cruda	Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	5	3	$m=10^6$ $M=10^7$	Reglamento Sanitario de los Alimentos - Artículo 173 (10.1)
Chile	Cecinas cocidas	Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	5	1	$m=5\times10^4$ $M=5\times10^5$	Reglamento Sanitario de los Alimentos - Artículo 173 (10.3)	
		Recuento de <i>E. coli</i>	5	1	$m=10$ $M=100$		
		Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	5	1	$m=10$ $M=100$		
		<i>C. perfringens</i>	5	1	$m=50$ $M=100$		
	Cecinas crudas (Cecinas crudas frescas y hamburguesas)	Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	5	3	$m=1\times10^6$ $M=1\times10^7$	Reglamento Sanitario de los Alimentos - Artículo 173 (10.4)	
		Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	5	1	$m=100$ $M=1000$		
		<i>C. perfringens</i>	5	1	$m=100$ $M=1000$		
	Cecinas crudas maduradas	Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	5	2	$m=10$ $M=100$	Reglamento Sanitario de los Alimentos - Artículo 173 (10.5)	

DESTINO	MATRIZ	MICROORGANISMO	PLAN DE MUESTREO		LÍMITES	NORMA	METODOLOGÍA
			n	c			
Chile	Cecinas crudas acidificadas	Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	5	2	$m=5 \times 10^5$ $M=1 \times 10^6$	Reglamento Sanitario de los Alimentos - Artículo 173 (10.6)	
		Recuento de <i>E. coli</i>	5	2	$m=50$ $M=500$		
		Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	5	2	$m=10$ $M=100$		
Brasil	Carnes crudas, añejadas o no, condimentada o no, refrigerada o congelados, envasados al vacío o no	Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	5	3	$m=1 \times 10^5$ $M=1 \times 10^6$	NORMATIVA N° 161, DEL 1 DE JULIO DE 2022 (Anexo 1 - punto 6)	
		Recuento de <i>E. coli</i> (UFC/g)	5	2	$m=10$ $M=100$		
	Carne molida, productos cárneos crudos moldeados, condimentada o no, refrigerada o congelados (hamburguesas, albóndigas, kibbeh)	Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	5	3	$m=1 \times 10^5$ $M=1 \times 10^6$	NORMATIVA N° 161, DEL 1 DE JULIO DE 2022 (Anexo 1 - punto 6)	
		Recuento de <i>E. coli</i> (UFC/g)	5	2	$m=10$ $M=100$		
		Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	5	2	$m=100$ $M=10000$		
	Carne cruda y productos cárnicos menudencias internas saladas, externas y piel	Recuento de <i>E. coli</i> (UFC/g)	5	2	$m=<10$ $M=100$	NORMATIVA N° 161, DEL 1 DE JULIO DE 2022 (Anexo 1 - punto 6)	
		Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	5	2	$m=100$ $M=1000$		
	Productos cárnicos cocidos, curado o no, ahumado o no, desecado o no, incrustado o no, refrigerado o no (mortadela, chorizo, jamón, morcilla, patés).	Recuento de <i>E. coli</i> (UFC/g)	5	2	$m=<10$ $M=100$	NORMATIVA N° 161, DEL 1 DE JULIO DE 2022 (Anexo 1 - punto 6)	
		Recuento de Estafilococos coagulasa positiva (UFC/g)	5	1	$m=100$ $M=1000$		
		Recuento de <i>C. perfringens</i>	5	1	$m=100$ $M=1000$		
Unión Europea	Canales de bovinos, ovinos, caprinos y equinos	Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)			$m=3,5 \log \text{UFC/cm}^2$ $M=5,0 \log \text{UFC/cm}^2$	Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005 (Capítulo 2, Categoría de alimento 2.1.1)	ISO 4833-1
		Recuento de Enterobacteriaceae (UFC/g)			$m=1,5 \log \text{UFC/cm}^2$ $M=2,5 \log \text{UFC/cm}^2$		
	Carne picada	Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	5	2	$m=5 \times 10^5$ $M=5 \times 10^6$	Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005 (Capítulo 2, Categoría de alimento 2.1.6)	ISO 4833-1
		Recuento de <i>E. coli</i> (UFC/g)	5	2	$m=50$ $M=500$		
	Carne separada mecánicamente	Recuento de aerobios mesófilos (UFC/g)	5	2	$m=5 \times 10^5$ $M=5 \times 10^6$	Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005 (Capítulo 2, Categoría de alimento 2.1.7)	ISO 4833-1
		Recuento de <i>E. coli</i> (UFC/g)	5	2	$m=50$ $M=500$		
	Preparados cárnicos	Recuento de <i>E. coli</i> (UFC/g)	5	2	$m=500 \text{ UFC/g or cm}^2$ $M=5000 \text{ UFC/g or cm}^2$	Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005 (Capítulo 2, Categoría de alimento 2.1.8)	ISO 16649 partes -1 o 2
Estados Unidos	Muestras extraídas de tejido	Escherichia coli genérico (Biotipo 1)	13	3	$m=\text{negativa}$ $M=100 \text{ UFC/cm}^2$ Rango aceptable: negativo		
	Muestras extraídas por esponjado		13	3	$m=\text{UFC/cm}^2$ hasta el valor promedio más un desvío estándar 2 $M=\text{Valores de UFC/cm}^2$ obtenidos entre el rango aceptable y el rango inaceptable Rango aceptable: $\text{UFC/cm}^2$ hasta el valor promedio más un desvío estándar		

\* media logarítmica diaria

## B. PREPARACION Y SIEMBRA DE MUESTRAS PARA RECUENTOS DE INDICADORES

Para muestras de carne se efectúa preferentemente la siembra de por lo menos dos diluciones sucesivas (en producto crudo) para evitar la aparición de placas donde la elevada cantidad de colonias dificulte la lectura o por el contrario una porción de muestra demasiado diluida no brinde un dato preciso. En lo posible, realizar la siembra de cada dilución por duplicado, para poder obtener un resultado más certero (tomando como resultado, el promedio de las dos placas de la misma dilución).

Vale recordar que, en el método convencional, el recuento aceptable de bacterias debe estar entre 30-300 colonias por placa, mientras que en hongos y levaduras debe ser de 15-150. Estos límites se basan en el análisis estadístico en el que se considera el tamaño de la placa frente al espacio mínimo de diferentes colonias que se pueden cultivar en la placa sin superponerse. De esta manera se evita la subestimación de los recuentos. En la figura 27 se detallan algunas recomendaciones de diluciones, según la matriz.

Se recomienda rotular las placas con marcador indeleble identificando el número de muestra y dilución a sembrar.

Para la siembra, se pipetea 1 ml de la muestra utilizando una micropipeta y tip estéril o bien pipeta de vidrio o descartables (estériles) de 1 o 2 ml. Se coloca la pipeta perpendicularmente a la placa y se siembra cuidadosamente 1 ml de la muestra en el centro de la placa o lámina inferior (según la técnica utilizada).

Para las técnicas de siembra en profundidad, una vez fundido el medio a utilizar, se recomienda mantenerlo en un baño termos-tático a  $45\pm1^{\circ}\text{C}$  durante no menos de 40 min. De esta manera, se logra que el medio de cultivo llegue a la temperatura adecuada antes de proceder al vertido en placa o plaqeado, evitando así dañar a los microorganismos. Posteriormente, se preparan dos placas de Petri estériles por muestra y por dilución. Para cada muestra se transfiere 1 ml de muestra, si es líquida, o 1 ml de la suspensión inicial (dilución  $10^{-1}$ ) en otros productos. En otras dos placas se repite este procedimiento, dispensando 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  de producto líquido o 1 ml de la dilución  $10^{-2}$  para otros productos. A

	Aerobios totales	Enterobacterias	E. coli / Coliformes	Staphylococcus	Hongos y Levaduras	Anaerobios Sulfíticos reductores
Cortes y materia prima carnica	1/100		1/10	1/10		
Hamburguesas / medallones	1/1000		1/100	1/10		
Menudencias	1/10000		1/100	1/10		
Esponjados pre/operacional	1/10	1/10				
Soja texturizada	1/1000		1/10	1/10		
Harina de Soja	1/1000		1/10		1/100	
Esponjado de carcasa			directo			

Figura 27. Recomendación de diluciones según matriz para un muestreo realizado inmediatamente después del proceso de fabricación.

continuación, se incorpora cuidadosamente el medio de cultivo fundido y atemperado, entre 12 y 15 ml, intentando que no caiga directamente sobre la muestra. Homogeneizar el medio de cultivo con la muestra girando la placa en sentido horario y antihorario, aproximadamente 5 veces por lado. Se deja solidificar sobre una superficie plana y se lleva a incubar las placas de forma invertida según las indicaciones de la metodología.

Cuando el recuento de colonias deba realizarse en forma manual, podrá optarse por lo siguiente:

Si se observa que la distribución de las colonias es homogénea en la superficie de la placa, es válido contar las colonias presentes en un área de 1 cm<sup>2</sup>, y multiplicar el resultado por el área total de la placa. Por ejemplo, si el área circular de cultivo es aproximadamente de 20 cm<sup>2</sup>. Se pueden hacer estimaciones en las placas que contienen más de 250 colonias contando un número representativo de cuadrados y multiplicando por el número apropiado para obtener un recuento estimado para el total de los 20 cm<sup>2</sup>. Si en cada uno de tres cuadrados se contó 14, 13 y 12 colonias, efectuando el promedio se obtienen 13 colonias/cuadrado. Considerando que el área de cultivo es de 20 cm<sup>2</sup> el resultado final es: 13 colonias x 20 cuadrados = 260 colonias / ml sembrado o placa.

## PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

### - Alimento

En caso de que la muestra se encuentre congelada se la puede descongelar manteniéndola por no más de 18 h a temperatura de refrigeración (2-8°C). No deben transcurrir más de 15 min entre que la muestra fue homogeneizada y la posterior siembra. Se pesan en forma aséptica 10, 25 o 50 g de la muestra. Se agrega 90, 225 o 450 ml de diluyente de Butterfield o agua peptonada, respectivamente. Se homogeniza la muestra durante 2 min.

Esta dilución se designa como 10<sup>-1</sup>. Si es necesario se pueden preparar diluciones decimales sucesivas (10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, etc.), que se realizarán colocando 1 ml de la dilución anterior en 9 ml de diluyente. Se agitan las diluciones utilizando un agitador de mesada. Actualmente, existen equipos para realizar el pesaje y la primera dilución de la muestra de forma automática.

### - Esponjado de media res

Antes de procesar la muestra se agregan 15 ml de diluyente para lograr un volumen final de 25 ml (teniendo en cuenta que la esponja fue previamente hidratada con 10 ml). Se homogeniza la muestra durante 2 min. Si es necesario se pueden preparar diluciones decimales sucesivas (10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, etc.), que se realizarán colocando 1 ml de la dilución anterior en 9 ml de diluyente. Se agitan las diluciones preparadas utilizando un agitador de mesada.

### - Esponjado de superficies

La esponja recibida se hidrata con 90 ml de diluyente para completar 100 ml de diluyente final (teniendo en cuenta que la esponja fue previamente hidratada con 10 ml). Si es necesario se pueden preparar diluciones decimales sucesivas (10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, etc.), que se realizarán colocando 1 ml de la dilución anterior en 9 ml de diluyente. Se agitan las diluciones utilizando un agitador de mesada.

### - Hisopados de superficies

Para el caso de hisopados de superficies se considera como superficie muestreada 20 cm<sup>2</sup> (salvo aclaración del cliente indicando lo contrario) y volumen de diluyente 10 ml (generalmente, también podrían agregarse de 10 a 40 ml de acuerdo con la dilución pretendida). Si es necesario se pueden preparar diluciones decimales sucesivas (10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, etc.), que se realizarán colocando 1 ml de la dilución anterior en 9 ml de diluyente. Se agitan las diluciones utilizando un agitador de mesada.

## C. METODOLOGÍAS PARA RECUENTO DE INDICADORES

En esta sección del capítulo analizaremos las diferentes metodologías para recuento de indicadores:

- **MÉTODOS TRADICIONALES:** descritos en normas internacionales y considerados *gold standard*. Se incluyen Normas ISO, FDA-BAM, ICMSF.

- **MÉTODOS RÁPIDOS:** métodos alternativos disponibles en Argentina, los cuales fueron validados contra los métodos tradicionales. Se incluyen Petrifilm, MC Media Pad, Compact Dry, SistemaTEMPO, Sim-Plate.

**Tabla 24.** Ejemplos de metodologías oficiales (ISO) en las que se utilizan medios de cultivo sólidos y líquidos para el recuento de microorganismos indicadores.

MEDIOS SÓLIDOS	
Recuento en superficie	<ul style="list-style-type: none"><li>- ISO 11290-2:2017 Método horizontal para la detección y enumeración de <i>Listeria monocytogenes</i>. Parte 2: Método de enumeración.</li></ul>
Recuento en profundidad	<ul style="list-style-type: none"><li>- ISO 4833-1:2013 Método horizontal para la enumeración de microorganismos. Parte 1: Técnica de recuento de colonias en profundidad a 30°C.</li><li>- ISO 21528-2:2017 Método horizontal para la detección y enumeración de <i>Enterobacteriaceae</i>. Parte 2: Técnica de recuento de colonias.</li><li>- ISO 4832:2006 Método horizontal para la enumeración de coliformes. Técnica de recuento de colonias.</li><li>- ISO 6888-1:2021 Método horizontal para la enumeración de estafilococos coagulasa positiva (<i>Staphylococcus aureus</i> y otras especies). Parte 1: Método que utiliza agar Baird-Parker.</li><li>- ISO 6888-2:2021/Amd 1:2023 Método horizontal para la enumeración de estafilococos coagulasa positiva (<i>Staphylococcus aureus</i> y otras especies). Parte 2: Método que utiliza agar plasma de conejo con fibrinógeno.</li><li>- ISO 21527-1:2008 Método horizontal para la enumeración de hongos y levaduras. Parte 1: Técnica de recuento de colonias en productos con actividad de agua mayor a 0,95.</li></ul>
Anaerobiosis	<ul style="list-style-type: none"><li>- ISO 15213-1:2023 Método horizontal para la detección y enumeración de <i>Clostridium</i> spp. Parte 1: Técnica de recuento de colonias de <i>Clostridium</i> spp. sulfito-reductores.</li></ul>

MEDIOS LÍQUIDOS	
Número Más Probable (NMP)	<ul style="list-style-type: none"><li>- ISO 21528-1:2017 Método horizontal para la detección y enumeración de <i>Enterobacteriaceae</i>. Parte 1: Detección de <i>Enterobacteriaceae</i>.</li><li>- ISO 16649-3:2015 Método horizontal para la detección de <i>Escherichia coli</i> beta-glucuronidasa-positiva. Parte 3: Técnica de detección y número más probable usando 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-glucurónido.</li><li>- ISO 6888-3:2003 Método horizontal para la enumeración de estafilococos coagulasa positiva (<i>Staphylococcus aureus</i> y otras especies). Parte 1: Técnica de detección y número más probable (NMP) para bajo recuento.</li></ul>

## C.1. MÉTODOS TRADICIONALES

En esta sección presentaremos métodos tradicionales para diferentes microorganismos según algunas Normas ISO para recuento de microorganismos indicadores en medios sólidos (en superficie, en profundidad y en anaerobiosis), en medios líquidos (NMP).

## I.- RECUENTO EN MEDIOS SÓLIDOS

### Norma ISO 7218 Guía y requisitos generales para ensayos microbiológicos

#### a) Recuento de microorganismos en superficie

Los métodos que utilizan siembra en superficie presentan ciertas ventajas sobre aquellos métodos que utilizan siembra en profundidad. La morfología de las colonias en superficie se observa con facilidad, aumentando la capacidad del analista para distinguir entre distintos tipos de colonias.

Los microorganismos no se exponen al calor del medio de agar fundido, por lo que pueden conseguirse recuentos más altos.

Se utilizan placas previamente vertidas, con un medio de agar de cómo mínimo 3 mm de espesor, planas y sin burbujas de aire ni humedad en su superficie. La placa de Petri debería estar rotulada con el número de la muestra, la dilución, la fecha y cualquier otra información que se desee incluir.

#### Materiales

- Pipetas estériles o micropipetas (con tips estériles) con capacidad de 0,1 a 0,5 ml.
- Placas de Petri de 90 mm y de 140 mm de diámetro.
- Tubos de ensayo.
- Frascos de vidrio (aptos para autoclaves).
- Espátula de Drigalsky de vidrio estéril o de plástico estéril descartable.
- Porta placas.
- Rotulador indeleble.
- Estufa de cultivo.

#### Siembra

Utilizando una pipeta estéril, se transfiere el inóculo (generalmente, entre 0,1 ml y 0,5 ml) de la muestra para análisis, cuando ésta es líquida, o de la suspensión inicial, para el resto de las muestras, en la placa de agar (de 90 mm o de 140 mm de diámetro, según corresponda). Se repite este paso para la siguiente dilución decimal (las colonias que se van a contar estarán presentes en una dilución de  $10^{-1}$  para muestras de materiales líquidos y de  $10^{-2}$  para muestras de otros materiales). Si es necesario, se repite con diluciones decimales adicionales.

Si en algún producto es necesario detectar bajos recuentos bacterianos, el límite de detección puede aumentarse en un factor de 10 analizando 1 ml de muestra, para los productos líquidos, y 1 ml de la suspensión inicial para el resto de los productos. En este caso, se extiende 1 ml del inóculo sobre la superficie de una placa de agar grande (de 140 mm de diámetro) o sobre la superficie de tres placas de agar pequeñas (de 90 mm de diámetro).

Utilizando una espátula de Drigalsky de vidrio, plástico o acero, se extiende el inóculo lo más deprisa posible de forma homogénea sobre la superficie del agar, sin tocar las paredes de la placa de Petri. Se deja absorber el inóculo durante unos 15 min a temperatura ambiente con las tapas de las placas puestas.

En algunas ocasiones, el inóculo se puede depositar sobre una membrana y a continuación extenderse según se describió anteriormente.

#### Incubación

Salvo que las normas específicas indiquen lo contrario, las placas se invierten inmediatamente después de la siembra y se llevan rápidamente a una estufa de cultivo.

Durante el período de incubación, es inevitable, y aceptable, que se produzcan pequeñas fluctuaciones en la temperatura de incubación, por ejemplo, durante las operaciones normales de carga y descarga de la estufa de cultivo. Es importante que estos períodos se reduzcan al mínimo. La duración de dichas fluctuaciones debería monitorizarse para asegurar que no ejercen un efecto significativo sobre los resultados.

En algunas circunstancias, puede ser mejor para la organización del trabajo en el laboratorio, refrigerar las placas inoculadas durante un tiempo máximo de 24 h antes de su uso. En este caso, el laboratorio debe asegurar que esta práctica no afectará al resultado del recuento.

De forma general, las placas de Petri no deberían apilarse en más de seis para la incubación aeróbica, y deberían separarse unas de otras y de las paredes de la estufa de cultivo en una distancia de 25 mm como mínimo. Sin embargo, cuando las estufas de cultivo tienen sistemas de circulación de aire, se pueden apilar más placas y dejar espacios más reducidos. En este caso, se debe verificar la distribución de la temperatura.

La incubación de las placas se realiza según la metodología específica. Por ejemplo para *L. monocytogenes* se incuba a 35-37°C por 24 h.

Habitualmente, las placas son examinadas luego del período de incubación. Sin embargo, y salvo que las normas específicas indiquen lo contrario, pueden almacenarse en la heladera durante un tiempo de hasta 48 h. Solamente es aceptable un almacenamiento refrigerado durante períodos más prolongados si se demuestra que no afecta el número, la apariencia o la confirmación de colonias. Cuando los medios contienen colorantes indicadores, las placas deben ser atemperadas a 20-25°C antes de la lectura de resultados, para ase-

gurarse de esta manera que se recupera el color correcto.

Expresión de los resultados: se recomienda ver el punto D de este capítulo (análisis y expresión de resultados obtenidos en medios sólidos).

### b) Siembra en profundidad

La placa de Petri debe estar rotulada con el número de la muestra, la dilución, la fecha y cualquier otra información que se desee incluir.

Deben seleccionarse las diluciones adecuadas que aseguren que las placas contienen un número adecuado de colonias y evitar posibles problemas de inhibición.

Se utilizan pipetas estériles diferentes para transferir las distintas diluciones, salvo si se trabaja desde la más diluida a la más concentrada.

### Materiales

- Pipetas estériles o micropipetas (con tips estériles) con capacidad de 1 ml.
- Placas de Petri de 90 mm de diámetro.
- Tubos de ensayo.
- Frascos de vidrio (aptos para autoclaves).
- Porta placas.
- Rotulador indeleble.
- Estufa de cultivo.

### Técnica

Se toman los volúmenes adecuados de la dilución que se va a examinar, tocando la punta de la pipeta contra el lateral del tubo para eliminar el exceso de líquido que pudiera haberse quedado en la parte externa. Se levanta la tapa de la placa de Petri a la altura justa para introducir la pipeta, y se dispensa a continuación su contenido.

Se vierte sobre cada placa de Petri el medio de agar fundido, a una temperatura de entre 44-47°C. Se evita verter directamente el medio sobre el inóculo. Se mezcla inmediatamente con suavidad el medio fundido con el inóculo, para conseguir una distribución homogénea de los microorganismos dentro del mismo. Se deja enfriar y solidificar colocando la placa de Petri sobre una superficie horizontal fría (el tiempo de solidificación del agar no debe ser superior a 10 min).

Cuando se retira el medio de agar fundido del baño de agua, se seca la botella con una toallita limpia para evitar que el agua contamine las placas. Se evita que el medio salpique fuera del recipiente o en el interior de la tapa de las placas cuando se está vertiendo. Esto puede requerir mantener el frasco en una posición casi horizontal y no apoyar el frasco entre vertido y vertido.

Si se sospecha la presencia de colonias con capacidad invasiva en el producto que se está analizando (por ejemplo, de *Proteus* spp.), se puede agregar una segunda capa de agar cuando el agar inicial está solidificado. Esta segunda capa puede ser de un agar no-nutritivo estéril, o del mismo agar que se utilizó para realizar la primera capa.

La incubación de las placas se realiza según la metodología específica. Por ejemplo para BAM se incuba  $30\pm1^{\circ}\text{C}$  por  $72\pm3$  h.

Expresión de los resultados: se recomienda ver el punto D de este capítulo (análisis y expresión de resultados obtenidos en medios sólidos).

### c) Recuento en anaerobiosis (ISO 15213-1:2023)

#### Siembra e incubación

Se retiran los tubos estériles o frasco Schott con el medio de cultivo del autoclave y se regeneran en baño termostático a 100°C durante 10 min. Las soluciones y

medios de cultivo, en contacto con la atmósfera, contienen aire disuelto que perjudica el crecimiento de las bacterias anaerobias estrictas, como son los Clostridios. La regeneración del medio de cultivo tiene como objetivo expulsar el aire. Luego de regenerarlos, se enfrián rápidamente y se mantienen atemperados a 44-47°C.

Se siembra 1 ml de cada dilución decimal de la muestra en placas estériles. Posteriormente, se vierten aproximadamente 15 ml del Agar Hierro Sulfito regenerado y atemperado. Se mezcla suavemente con movimientos rotatorios para un lado y el otro de las agujas del reloj evitando cualquier derrame y se deja solidificar. Cuando el medio esté solidificado, se agrega una nueva capa de 5-10 ml de Agar Hierro Sulfito.

Las placas se colocan en una jarra de anaerobiosis, con un sobre de Anaerocult A y un control de anaerobiosis.

**NOTA:** Puede considerarse la sustitución de las placas estériles por tubos con Agar Hierro Sulfito. En ese caso se siembra 1 ml de muestra en cada tubo atemperado a 44-47°C. Se homogeneiza evitando la formación de burbujas de aire. Una vez solidificado, se agregan 2-3 ml del mismo medio para sellar cada tubo. En caso de utilizar tubos no es necesario incubar en jarra de anaerobiosis.

**NOTA:** En caso de que por pedido del cliente se requiera el recuento de esporas de bacterias sulfato reductoras anaerobias, se calienta la muestra para eliminar todas las formas vegetativas de bacterias formadoras y no formadoras de esporas sometiéndose a 75°C durante 20 min. En caso de que el cliente especifique otra combinación de tiempo/temperatura, se siguen sus instrucciones.

La incubación de las placas se realiza a  $37\pm1^{\circ}\text{C}$  por 24-48 h. En caso de que se sospeche la presencia de bacterias termó-

filas o por solicitud de recuento de bacterias sulfito reductoras anaerobias termófilas, se incuba un set de muestras a  $50\pm1^{\circ}\text{C}$  durante 24-48 h.

Para el recuento de Clostridios sulfito reductores también puede usarse el *Differential Reinforced Clostridial Agar* el cual puede tener una mejor recuperación de los anaerobios estrictos por los agentes reductores incluidos en el medio de cultivo.

### Lectura e interpretación

Se cuantifican todas las colonias negras. El ennegrecimiento indica la reducción de los iones sulfatos y la formación de sulfuro de hierro (de color negro).

Expresión de los resultados: se recomienda ver el punto D de este capítulo (análisis y expresión de resultados obtenidos en medios sólidos).

## II.- RECUENTO EN MEDIOS LÍQUIDOS

### Recuento por técnica del Número Más Probable-NMP (ISO 7218)

Se inoculan las porciones de análisis en un medio líquido diseñado para permitir el desarrollo de un microorganismo o un grupo de microorganismos determinados, y que normalmente inhibe la proliferación de los demás microorganismos.

Pueden utilizarse distintos criterios para determinar el desarrollo de los microorganismos estudiados, como por ejemplo la detección visual de la turbidez, la producción de gas, los cambios de color o el posterior aislamiento de los microorganismos en un medio de agar selectivo. La composición del medio de cultivo y los criterios con los que discriminar entre un resultado positivo o negativo se definen en las normas correspondientes.

Mediante esta aproximación sólo se puede asignar un valor cualitativo a cada porción de análisis, es decir, el resultado solamente puede ser positivo o negativo. Para obtener una estimación de la cantidad de microorganismos presentes es necesario examinar varias porciones de análisis y aplicar procedimientos estadísticos para determinar el NMP.

### Materiales

- Pipetas estériles o micropipetas (con tips estériles) con capacidades de 0,1 a 10 ml.
- Tubos de ensayo con campanas de Durham.
- Frascos de vidrio (aptos para autoclaves).
- Rotulador indeleble.
- Estufa de cultivo.

### Procedimiento

Salvo que las normas específicas indiquen lo contrario, los volúmenes de porción de análisis iguales o inferiores a 1 ml se pueden añadir normalmente a volúmenes cinco o diez veces superiores de los medios ya preparados a la concentración de trabajo. Las porciones de análisis de entre 1 ml y 100 ml se pueden añadir normalmente a volúmenes iguales de los medios a concentración doble de la de trabajo.

Para volúmenes superiores a 100 ml, pueden utilizarse medios más concentrados. En casos especiales, los medios estériles deshidratados se pueden disolver en la muestra que se va a analizar refrigerada (o previamente calentada a  $30^{\circ}\text{C}$ ).

Salvo indicación contraria, el intervalo transcurrido entre la preparación de la primera dilución de la muestra y la inoculación del último tubo debe ser inferior a 30 min. Debe utilizarse una pipeta estéril nueva para cada dilución.

## Elección del sistema de inoculación

Se escoge entre las diversas configuraciones posibles de NMP en función del número esperado de microorganismos de la muestra analizada, las necesidades normativas, la precisión requerida, y cualquier otra consideración práctica. A modo de ejemplo se presenta el sistema de dilución única:

### Sistema de dilución única

Cuando la concentración esperada de microorganismos es pequeña o se espera que varíe solamente de forma moderada, el sistema de inoculación más adecuado es el de una serie única de porciones de análisis iguales. Si se espera que la proporción aproximada entre el número máximo y el número mínimo de microorganismos va a ser inferior a 25, el número mínimo de porciones de análisis en paralelo con las que se espera que salga bien es de 10; para 50 tubos en paralelo, el límite es una proporción de 200.

**NOTA:** recurrir a la norma ISO 7218:2007 donde se encuentran detallados ejemplos de NMP de dilución única.

## DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE NMP

Hay tres posibilidades distintas de determinar el valor de NMP: el cálculo mediante fórmulas matemáticas, la consulta de tablas de NMP o el empleo de programas informáticos específicos. Siempre que se basen en las mismas consideraciones estadísticas, las tres son igualmente válidas. Uno de estos tres métodos se detalla a continuación.

### - Fórmulas matemáticas:

#### Estimación de la precisión en análisis de dilución única

Los límites de confianza al 95% de la estimación del NMP pueden calcularse de forma aproximada mediante la ecuación:

$$x = \frac{m_t}{m_m} \ln \left[ \frac{n}{z_n \pm 2\sqrt{\frac{z(n-z_n)}{n}}} \right]$$

donde

$x$  es el límite superior o inferior del intervalo de confianza al 95 %;  
 $m_t$  es la masa de referencia de la muestra, en gramos;  
 $m_m$  es la masa de la muestra en cada tubo de la serie, en gramos;  
 $\ln$  es el logaritmo natural;  
 $n$  es el número de tubos de la serie;  
 $z_n$  es el número de tubos con reacción negativa.

El signo más está relacionado con el límite inferior y el signo menos con el límite superior. La aproximación no es muy buena cuando la mayoría de los tubos son negativos (estériles) pero mejora al aumentar el número de tubos positivos.

---

**Tablas de NMP:** recurrir a la norma ISO 7218:2007 donde se encuentran detalladas las tablas necesarias para el cálculo.

---

## Programas informáticos específicos

Los programas informáticos más versátiles no plantean restricciones en el número de diluciones ni en la simetría o en los tubos en paralelo del sistema de NMP. El *NMP Assay Analyzer* es un programa de acceso libre basado en un programa previo.

## Expresión final del resultado

Utilizando el índice de NMP determinado en la tabla [según la combinación de tres (o cinco) diluciones consecutivas escogidas], se determina la cantidad más probable de microorganismos en el volumen de referencia.

El resultado se expresa como el número más probable de microorganismos (o de un grupo específico de microorganismos) por g o por ml. La masa o el volumen de referencia pueden ser diferentes del g o del ml (por ejemplo 100 g o 100 ml).

## C.2. MÉTODOS RÁPIDOS

En esta sección se describirán los principales métodos rápidos para el recuento de microorganismos indicadores utilizados en laboratorios de plantas frigoríficas. En la tabla 25 se presentan las alternativas de métodos rápidos disponibles en Argentina para el recuento de microorganismos descritos en este capítulo.

### - PETRIFILM™

Las placas Petrifilm™ son un sistema compuesto por un medio de cultivo listo para usar que contiene nutrientes, un agente gelificante soluble en agua fría y una tecnología de indicador (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio, Tetrazolium o TTC) de detección dual que facilita la enumeración de colonias. Todos estos componentes son necesarios para el crecimiento microbiano. No es necesaria la preparación de medios de cultivo, disminuyendo así tiempo y mano de obra de laboratorio.

En cuanto a los diluyentes estériles a utilizar (ver capítulo IV) para la preparación de la muestra es importante agregar una cantidad apropiada de ellos. No usar buffers que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato ya que pueden inhibir el crecimiento.

### Siembra e incubación (AOAC 990.12)

Usaremos como ejemplo BAM. La técnica de siembra se presenta en la Figura 28. Se incuban las placas horizontalmente, con la lámina transparente hacia arriba, en pilas que no excedan las 20 placas. Se incuban a  $35\pm1^{\circ}\text{C}$  durante 45,5 a 51 h.

En caso de realizar solo una dilución, se recomienda efectuar la siembra por duplicado. Si se realiza más de una dilución, no se considera necesario ya que podríamos comparar los resultados de dos diluciones sucesivas.

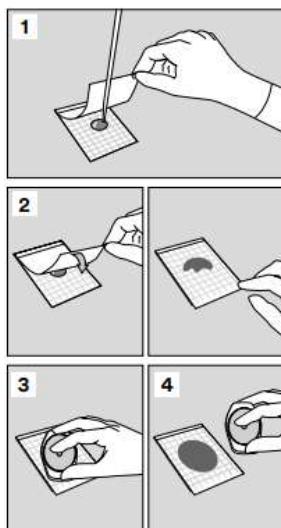
### Lectura e interpretación

El conteo de las Placas Petrifilm se efectúa de forma manual o en el contador automático de placas Neogen. El rango de colonias a contar está detallado en la tabla 25. En caso de tener un número de colonias incontables, se debe repetir el análisis con la contramuestra guardada anteriormente, para evitar esta situación se recomienda realizar por lo menos tres diluciones sucesivas cuando es un producto nuevo o que no puedo estimar el resultado que voy a obtener. En el caso de sembrar la dilución por duplicado, se hace un promedio de los dos resultados obtenidos para obtener el resultado final.

La reducción del indicador de TTC origina el color rojo de las colonias. Todos los puntos rojos deben considerarse como colonias, aunque sean muy pequeños o poco intensos.

Algunos microorganismos pueden licuar el gel contenido en la placa, pudiéndose producir una difusión que oculte la presencia de otras colonias. Si la licuación del gel interfiere con el recuento, entonces debe hacerse un recuento estimado contando las áreas no afectadas.

**NOTA:** de no ser posible realizar el recuento de las placas en el lapso de 1 h luego de retirarlas de la estufa de cultivo, se pueden almacenar para enumerarlas en otro momento congelándolas en un recipiente hermético a una temperatura menor o igual a  $-15^{\circ}\text{C}$  durante un período máximo de 1 semana. Al momento de realizar la lectura e interpretación, dejar que las placas alcancen la temperatura ambiente.



#### Proceso de hidratación:

- 1** Colocar la placa 3M™ Petrifilm™ en una superficie nivelada. Colocar 1mL de diluyente para hidratación en el centro de la parte inferior de la placa.
- 2** Estirar cuidadosamente la película superior para que tenga contacto con el diluyente de hidratación y luego baje la película.
- 3** Presionar suavemente con el difusor para distribuir la muestra en la superficie circular antes de que se forme el gel.
- 4** Mantener la placa cerrada por un mínimo de una hora antes de usarse.

Figura 28. Técnica de siembra (información comercial).

Al momento de la lectura se puede optar por las siguientes variantes:

- **Manual:** se cuentan las colonias características de cada dilución realizada (tener en cuenta el máximo establecido para conteo de cada microorganismo según la Tabla 25). Para la expresión de resultados se recomienda ver el punto D de este capítulo (análisis y expresión de resultados obtenidos en medios sólidos).
- **Lector de placas:** es compatible con las placas Petrifilm™: BAM, *E. coli*/coliformes, coliformes, *E. coli* y Enterobacterias. Da resultados en cuatro segundos por placa.
- **Lector de placas avanzado:** enumera 10 placas Petrifilm™ diferentes: recuento aeróbico rápido, recuento rápido de coliformes, recuento rápido de *E. coli*/coliformes, hongos y levaduras, BAM, coliformes, Enterobacterias, *E. coli* y *S. aureus*. Cuenta con inteligencia artificial fija incorporada, la cual da el resultado en menos de seis segundos.

#### - MC-MEDIA PADS

Los MC-Media Pads cuentan con unas almohadillas cromogénicas conformadas por una estructura multicapa, que permite la difusión automática de la muestra, sin

necesidad de un difusor plástico.

Cuentan con un medio de crecimiento que se expande uniformemente por acción capilar, un polímero que absorbe el exceso de agua y un sustrato cromogénico de detección específica, promoviendo a la mejora en el tiempo de trabajo, garantizando resultados rápidos, precisos con óptimas lecturas de organismos indicadores.



Abra la película cobertora en diagonal, luego inocule la muestra en el centro de la almohadilla.

Después de la inoculación, la muestra se difundirá automáticamente por toda la almohadilla.



Cierre la lámina transparente e incube según las condiciones de aplicación.

Recuento.

Figura 29. Técnica de siembra (información comercial).

Las almohadillas tienen una estabilidad prolongada (periodo de validez de hasta 3 años) y son apilables (precisan de menor espacio tanto en almacenamiento como en incubación) ya que son mucho más pequeñas que las placas de agar convencionales.

Los paquetes abiertos pueden conservarse en heladera (2-15°C) durante un máximo de 4 semanas. Se utilizan directamente desde la heladera y no es necesario esperar a que se atemperen.

## Siembra en placas MC Media pads (AOAC 2019.02)

<https://abtlaboratorios.com/indicadores-placas-cromogenicas>

Usaremos como ejemplo BAM. Se siembra 1 ml de la dilución en el centro de la lámina inferior y se incuba a  $35\pm1^{\circ}\text{C}$  por  $24\pm2$  h. Para su incubación, se pueden apilar en bloques de hasta 20 placas.

En caso de realizar solo una dilución, se recomienda efectuar la siembra por duplicado. Si se realiza más de una dilución, no se considera necesario ya que podríamos comparar los resultados de dos diluciones sucesivas.

### Lectura e interpretación

Las placas cromogénicas MC Media pads para el recuento de aerobios mesófilos utilizan un medio que contiene Agar de Cultivo Estándar o PCA, compuesto por Tetrazol, un indicador redox que permite observar las colonias con una coloración roja. De esta forma, las colonias pueden distinguirse muy fácilmente sobre el agar y facilitar su recuento.

Al momento de la lectura se puede optar por las siguientes variantes:

- **Manual:** se cuentan las colonias de color rojo (reducción de TTC) de cada dilución realizada. El máximo establecido para recuento de cada microorganismo se presenta en la Tabla 25. Para la expresión de resultados se recomienda ver el punto D de este capítulo (análisis y expresión de resultados obtenidos en medios sólidos).

- **Lector de placas:** SPHEREFLASH® Contador de colonias automático.

### - COMPACT DRY

Compact Dry son placas compactas con una cubierta robusta que contiene medios cromogénicos listos para usar. Su cu-

bierta impide contaminaciones y derrames. No requiere el uso de difusor ni tiempo de gelificación, ya que el medio infundido en la almohadilla de tela se solidifica rápidamente tras la inoculación. Tampoco es necesario presionar, extender o inclinar las placas, lo cual las hace más prácticas. Las placas Compact Dry se pueden conservar a temperatura ambiente durante 18 y 36 meses.

Cuenta con una capacidad de apilamiento ilimitado sin comprometer el desarrollo del microorganismo objetivo. Sus colonias aisladas son de fácil recolección para posterior análisis.

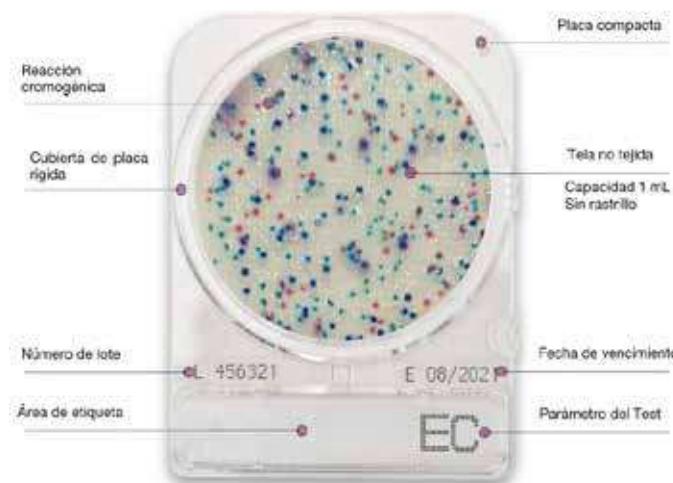


Figura 30. Descripción de una placa Compact Dry (información comercial).

### Siembra e incubación (AOAC-RI 010401)

Usaremos como ejemplo BAM. Se siembra 1 ml de la dilución y se incuba a  $35\pm2^{\circ}\text{C}$  por  $48\pm3$  h según AOAC, o según normas NordVal y MicroVal a  $30\pm1^{\circ}\text{C}$  por  $48\pm3$  h. En caso de realizar solo una dilución, se recomienda efectuar la siembra por duplicado. Si se realiza más de una dilución, no se considera necesario ya que podríamos comparar los resultados de dos diluciones sucesivas.

### Lectura e interpretación

Al momento de la lectura se puede optar por las siguientes variantes:

- **Manual:** la reducción del indicador de TTC origina el color rojo de las colonias. Todos los puntos rojos deben considerarse como colonias, aunque sean muy pequeños o poco intensos. En el caso de tener un número de colonias incontables se debe repetir el análisis con una contramuestra. Para evitar esta situación se recomienda realizar por lo menos tres diluciones sucesivas cuando es un producto nuevo o no es posible estimar el resultado. El rango de colonias a contar está detallado en la Tabla 25. Para la expresión de resultados se recomienda ver el punto D de este capítulo (análisis y expresión de resultados obtenidos en medios sólidos).

- **Lector de placas:** SPHEREFLASH® Contador de colonias automático.

### **- SIMPLATE**



Figura 31. Simplate (información comercial).

La tecnología de detección binaria de Simplate, combina medios y un dispositivo patentado para proporcionar resultados cuantitativos rápidos y precisos para grupos clave de microorganismos indicadores.

Los sustratos definidos incorporados al medio se utilizan para detectar múltiples reacciones enzimáticas y redox asociadas con los organismos objetivo, lo que produce cambios cromogénicos o fluorescentes en el medio, proporcionando resultados fáciles de leer.

Los medios SimPlate no contienen agar, se mantienen líquidos, por lo tanto, los nutrientes están fácilmente disponibles, listos para usarse, bastando hidratar con agua estéril, agua peptonada o agua peptonada tamponada.

Estos medios liofilizados se encuentran disponibles en formato de dosis unitaria para laboratorios de bajo volumen (1 prueba por tubo de medio) o formato de dosis múltiple para laboratorios de alto volumen (10 pruebas por tubo de medio). Se almacenan a temperatura ambiente.

Al tener un límite de recuento superior (según el fabricante 738 UFC), los reanálisis y las diluciones son minimizadas, economizando trabajo, tiempo y costos de materiales de laboratorio.

Para utilizar esta tecnología solo basta con mezclar la muestra con el medio y colocarlo en la placa Simplate, distribuir e incubar (Figura 32 a).

En la Figura 32 b se puede ver la placa previo a la incubación y en la Figura 32 c la placa luego de la incubación, con los pocios positivos que cambiaron de color.



**Figura 32.** Siembra y lectura de SimPlate (información comercial).

### Ejemplo de recuento y expresión del resultado

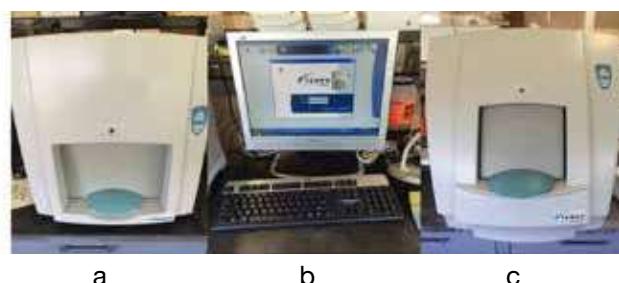
Luego de la incubación se identifican 7 pocillos con cambio de color respecto al color de fondo (7 positivos), se debe consultar la Tabla XX de conversión Simplate y se confirma que 7 pocillos positivos equivalen a una población de 14 NMP. Para determinar el número total de microorganismos se multiplica el resultado expresado en NMP por el factor de dilución:

$$\text{Organismos totales} = \text{Población} \times \text{factor de dilución} = 14 \times 10 = 140 \text{ UFC/ml}$$

positive wells = population*	positive wells = population	positive wells = population
1 = 2	29 = 70	57 = 190
2 = 4	30 = 74	58 = 196
3 = 6	31 = 76	59 = 202
4 = 8	32 = 80	60 = 208
5 = 10	33 = 84	61 = 216
6 = 12	34 = 86	62 = 224
7 = 14	35 = 90	63 = 232
8 = 16	36 = 94	64 = 240
9 = 18	37 = 96	65 = 248
10 = 22	38 = 100	66 = 256
11 = 24	39 = 104	67 = 266
12 = 26	40 = 108	68 = 276
13 = 28	41 = 112	69 = 288
14 = 30	42 = 116	70 = 298
15 = 32	43 = 120	71 = 312
16 = 36	44 = 124	72 = 324
17 = 38	45 = 128	73 = 338
18 = 40	46 = 132	74 = 354
19 = 42	47 = 136	75 = 372
20 = 46	48 = 142	76 = 392
21 = 48	49 = 146	77 = 414
22 = 50	50 = 150	78 = 440
23 = 54	51 = 156	79 = 470
24 = 56	52 = 160	80 = 508
25 = 58	53 = 166	81 = 556
26 = 62	54 = 172	82 = 624
27 = 64	55 = 178	83 = 738
28 = 68	56 = 184	84 = >738

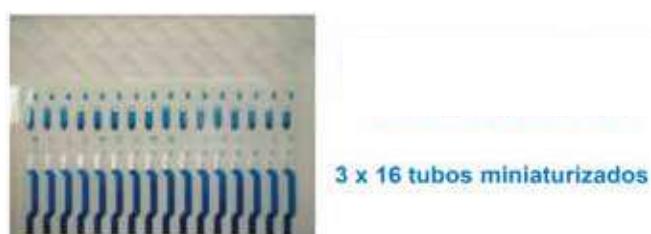
**Tabla XX.** Tabla de conversión Simplate.

### - SISTEMA TEMPO®



**Figura 33.** Estaciones de preparación, PC y software y lectura de TEMPO® (información comercial).

TEMPO es un sistema automatizado para recuento de microorganismos con base en el método de NMP. Está compuesto por una estación de preparación de muestras (Figura 33 a), una PC con un software específico (Figura 33 b) y una estación de lectura (Figura 33 c). Proporciona resultados precisos reduciendo los tiempos de preparación y lectura de resultados. Consiste en un método NMP miniaturizado con 3 series de 16 tubos. Cada serie tiene diferentes volúmenes (2,25 µl, 22,5 µl y 225 µl) (Figura 34).



**Figura 34.** Tarjeta plástica TEMPO® con pocillos de diferentes tamaños. Es un sistema miniaturizado del método NMP.

### Consumibles necesarios:

- Medios de cultivo TEMPO® deshidratados en viales. Facilitan un rápido crecimiento bacteriano y contienen un indicador fluorescente.
- Tarjetas TEMPO® para la inoculación, incubación y lectura automática.
- Bolsas con filtro TEMPO® para la preparación de las muestras.
- Kit TEMPO® QC para el control periódico del sistema TEMPO®.

### **Estación de preparación (Figura 33 a)**

- Para sembrar una dilución final 1/40 con rango de lectura <10 a 49.000 UFC se rehidrata un vial con 3 ml de agua estéril el cual luego se siembra con 1 ml de la solución madre (1/10) que proviene de la bolsa.
- Para sembrar una dilución final 1/400 con rango de lectura <100 a 490.000 UFC se rehidrata un vial con 3,9 ml de agua estéril el cual luego se siembra con 0,1 ml de la solución madre (1/10) que proviene de la bolsa.

Las tarjetas se llenan con la muestra a analizar y son selladas para su posterior incubación en estufa de cultivo. La temperatura y tiempo de incubación dependerá del microorganismo que se pretende analizar (Tabla 25).

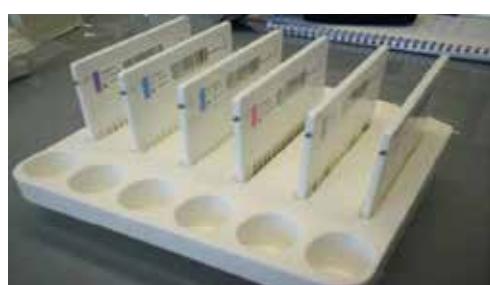


Figura 35. Bandeja de llenado TEMPO®

### **Estación de lectura (Figura 33 c)**

La lectura de las tarjetas se efectúa por una medición de la fluorescencia usando una cámara de arreglo lineal (CCD) con luz UV. Cada tarjeta es leída en 7 seg. La lectura para una bandeja completa (20 tarjetas) se realiza en 2,5 min.

La fluorescencia puede originarse debido a la actividad de la enzima 4MU (4-methylumbelliflorone) en las tarjetas para recuento de *E. coli* o por procesos de óxido-reducción efectuados por la nitro-re-

ductasa (7AMC: 7- aminocoumarin) de los siguientes microorganismos: hongos filamentosos y levaduras, BAL, BAM y *B. cereus*.

Para *Staphylococcus coagulasa*, Enterobacterias y coliformes totales, la lectura se da cuando desaparece la fluorescencia en el medio debido a su acidificación, como consecuencia del metabolismo de carbohidratos por parte de la molécula fluorescente 4MU a pH >7.

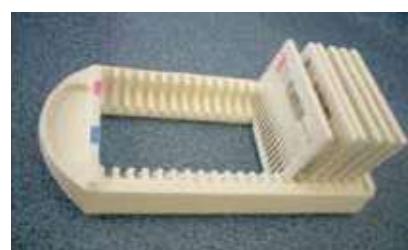


Figura 36. Bandeja de incubación y lectura TEMPO®

El software TEMPO® aplica métodos estadísticos para calcular el número de microorganismos presentes en la muestra inicial de forma automática. Los resultados se pueden expresar en UFC/g o NMP en el producto inicial.

El sistema asegura la trazabilidad del proceso completo.

Tabla 25. Kits de recuento de microorganismos indicadores disponibles en Argentina validados para carne bovina cruda\*

MICROORGANISMO	TÉCNICA UTILIZADA	INCUBACIÓN (TEMPERATURA Y TIEMPO)	LÍMITE MÁXIMO DE CONTEO DE COLONIAS	VALIDACIONES	PROVEEDOR
Aerobios Mesófilos Totales	Petrifilm	30±1°C, 72±3 h	300 UFC	AFNOR (Alimentos)	OneLab: info@onelab.com.ar Redilab: redilab@redilab.com.ar Neogen: pedidosARG@neogen.com
	Petrifilm (Rápido)	35±1°C, 24±2 h	300 UFC	AOAC (Carne picada)	
	Mc- Media Pad	35±1°C, 24±2 h	300 UFC	MicroVal (Alimentos)	Merck: atencion_industria@merckgroup.com
	Compact Dry	AOAC: 35±2°C, 48±3 h MicroVal y NordVal: 30±1°C, 48±3 h	300 UFC	AOAC (Carne picada) MicroVal (Alimentos) NordVal (Carne cruda)	Medica-tec S.R.L: ventas@medica-tec.com.ar Hixwer Argentina S.A.: info@hixwer.com
	TEMPO® AC	30±1°C, 24-48 h	4900 UFC	AFNOR/ISO 16140 BIO 12/35-05/13 Alimentos AOAC RI PTM Certificado 121204 Carne picada cruda	bioMérieux: consultas.ar@biomerieux.com
	SimPlate	30±1°C, 72±3 h	738 UFC	AOAC Official Method: 2002.07, 2002.11	Merck: atencion_industria@merckgroup.com
Enterobacterias	Petrifilm	37±1°C, 24±2 h	100 UFC	AFNOR (Alimentos)	OneLab: info@onelab.com.ar Redilab: redilab@redilab.com.ar Neogen: pedidosARG@neogen.com
	Compact Dry	AOAC: 35±2°C, 24±2 h MicroVal: 37°C, 24 h NordVal: 37±1°C, 24±2 h	300 UFC	AOAC (Carne picada) NordVal (Alimentos) MicroVal (Alimentos)	Medica-tec S.R.L: ventas@medica-tec.com.ar Hixwer Argentina S.A.: info@hixwer.com
	TEMPO® EB	37±1°C, 24±2 h	4900 UFC	AFNOR (Alimentos) AOAC (Carne)	bioMérieux: consultas.ar@biomerieux.com
	SimPlate	37±1°C, 24±2 h	738 UFC	AOAC Official Method: 2002.07, 2002.11, 2005.03	Merck: atencion_industria@merckgroup.com
Coliformes Totales	Petrifilm	30±1°C, 24±2 h	150 UFC	AFNOR (Alimentos)	OneLab: info@onelab.com.ar Redilab: redilab@redilab.com.ar Neogen: pedidosARG@neogen.com
	Petrifilm (Rápido)	30±1°C, 18-24 h	100 UFC	AOAC OMA#2018.13	
	Mc-Media Pad	35±1°C, 18-24 h	300 UFC	AOAC-PTM MicroVal	Merck: atencion_industria@merckgroup.com
	Compact Dry	MicroVal: 37±1°C, 24±2 h NordVal: 37±1°C, 24±2 h AOAC: 37±1°C, 24±2 h	300 UFC	AOAC (Carne picada) MicroVal (Alimentos) NordVal (Alimentos)	Medica-tec S.R.L: ventas@medica-tec.com.ar Hixwer Argentina S.A.: info@hixwer.com
	TEMPO® TC (Coliformes ISO)	30±1°C, 24-27 h	4900 UFC	AFNOR (Alimentos)	bioMérieux: consultas.ar@biomerieux.com
	SimPlate	37±1°C, 24±2 h	738 UFC	AOAC Official Method: 2002.07, 2002.11, 2005.03	Merck: atencion_industria@merckgroup.com

MICROORGANISMO	TÉCNICA UTILIZADA	INCUBACIÓN (TEMPERATURA Y TIEMPO)	LÍMITE MÁXIMO DE CONTEO DE COLONIAS	VALIDACIONES	PROVEEDOR
<i>Escherichia coli</i>	Petrifilm	35±1°C, 48±4 h	150 UFC	AOAC OMA #991.14 (Alimentos) AOAC (Carne cruda)	OneLab: info@onelab.com.ar Redilab: redilab@redilab.com.ar Neogen: pedidosARG@neogen.com
	Mc-Media Pad	35°C, 24 h	300 UFC	AOAC-PTM MicroVal	Merck: atencion_industria@merckgroup.com
	Compact Dry	AOAC: 35±2°C, 24±2 h MicroVal y NordVal: 37±1°C, 24±2 h	300 UFC	AOAC (Carne picada) NordVal (Alimentos) MicroVal (Alimentos)	Medica-tec S.R.L: ventas@medica-tec.com.ar Hixwer Argentina S.A.: info@hixwer.com
	TEMPO® EC	37±1°C, 24-27 h	4900 UFC	AFNOR (Alimentos) AOAC (Carne picada) Método oficial AOAC 2009.02	bioMérieux: consultas.ar@biomerieux.com
	SimPlate	37±1°C, 24±2 h	738 UFC	AOAC Official Method: 2002.07, 2002.11, 2005.03	Merck: atencion_industria@merckgroup.com
<i>Staphylococcus aureus</i>	Petrifilm	37±1°C, 24±2h	150 UFC	AOAC (Productos cárnicos) AFNOR (Alimentos)	OneLab: info@onelab.com.ar Redilab: redilab@redilab.com.ar Neogen: pedidosARG@neogen.com
	Compact Dry	MicroVal, NordVal: 37±1°C 24±2 h AOAC: 35±2°C, 24±2 h	300 UFC	NordVal (Alimentos) MicroVal (Alimentos)	Medica-tec S.R.L: ventas@medica-tec.com.ar Hixwer Argentina S.A.: info@hixwer.com
	TEMPO® STA	34-38°C, 24±2 h	4900 UFC	AFNOR (Alimentos)	bioMérieux: consultas.ar@biomerieux.com
Hongos filamentosos y levaduras	Petrifilm	20-25°C, 3-5 días	150 UFC	AOAC OMA #997.02 (Alimentos)	OneLab: info@onelab.com.ar Redilab: redilab@redilab.com.ar Neogen: pedidosARG@neogen.com
	MC-Media Pad	25±1°C, 48-72 h		AOAC-PTM Microval	Merck: atencion_industria@merckgroup.com
	Compact Dry	25±2°C, 3-7 días	300 UFC	NordVal (Alimentos) MicroVal (Alimentos) AOAC	Medica-tec S.R.L: ventas@medica-tec.com.ar Hixwer Argentina S.A. info@hixwer.com
	Compact Dry (Rápido)	AOAC: 25±2°C, 48-72 h NordVal, MicroVal: 25±1°C, 3 días	300 UFC	NordVal #050 MicroVal #2016LR61	
	SimPlate	25±1°C, 72±2 h	738 UFC	AOAC OMA: 2002.07, 2002.11, 2005.03 MicroVal 2009LR25 Todas las categorías de alimentos con actividad de agua superior a 0,95	Merck: atencion_industria@merckgroup.com
	TEMPO® YM	72-76 h	4900 UFC	AOAC RI PTM 041001	bioMérieux: consultas.ar@biomerieux.com
<i>Listeria spp.</i>	Compact Dry	35±1°C, 24±2 h	300 UFC	MicroVal (Carne)	Medica-tec S.R.L: ventas@medica-tec.com.ar Hixwer Argentina S.A. info@hixwer.com
Bacterias ácido lácticas	Petrifilm	30±1°C, 48±3 h	150 colonias con gas o 300 colonias sin gas	AFNOR (Alimentos)	OneLab: info@onelab.com.ar Redilab: redilab@redilab.com.ar Neogen: pedidosARG@neogen.com

## D. ANALISIS Y EXPRESION DE RESULTADOS OBTENIDOS EN MEDIOS SOLIDOS (aplica a métodos tradicionales y a métodos rápidos)

Los cálculos se efectúan de acuerdo con lo establecido en la Norma ISO 7218:2007/Amd.1:2013 considerando los siguientes casos probables:

### Caso general

Considerando un recuento de al menos 10 colonias en alguna placa a partir de diluciones sucesivas.

El número total de microorganismos en la muestra se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\sum CV}{V \times 1.1 \times d}$$

Donde:

N: UFC/g

CV: suma de las colonias obtenidas de dos placas de diluciones sucesivas, en donde una de ellas contenga al menos 10 colonias.

V: volumen de homogenato inoculado en cada una de las placas expresado en ml.

d: menor dilución utilizada.

Por ejemplo, utilizando para las diluciones volúmenes de homogenato de 1 ml, si en la dilución  $10^{-2}$  se contaron 165 colonias y en  $10^{-3}$  se contaron 14 colonias se realiza un promedio utilizando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{165 + 14}{1 \times 1,1 \times 10^{-2}} = 16.272$$

Por lo que el resultado final redondeado, se expresa como 16.000 UFC/g.

### - Cuando la placa sin diluir o de dilución inicial contiene menos de 10 colonias

Cuando la placa contiene menos de 10 colonias, pero por lo menos 4, se calcula el resultado final como en el punto anterior.

Cuando la placa contiene de 1 a 3 colonias el resultado se expresa como:

$$N < 4 \times 1/d$$

Por ejemplo, utilizando para las diluciones volúmenes de homogenato de 1 ml, si en la dilución  $10^{-1}$  se contaron 3 colonias y en  $10^{-2}$  se contaron 0 colonias el resultado es:

$$N < 4 \times 1/10^{-1} \text{ UFC/g}$$

Por lo que el resultado final se expresa como <40 UFC/g.

### - Si la primera dilución no contiene colonias el resultado se expresa como

$$N < 1/d$$

Por ejemplo, utilizando para las diluciones volúmenes de homogenato de 1 ml, si en la dilución  $10^{-1}$  se contaron 0 colonias y en  $10^{-2}$  se contaron 0 colonias el resultado es:

$$N < 1/10^{-1} \text{ o } N < 10 \text{ UFC/g}$$

### - Cuando el resultado del recuento de una dilución es >300 y la siguiente dilución es <300

Solamente considerar para el cálculo el recuento de la dilución más lejana a la del homogenato.

Por ejemplo, utilizando para las diluciones volúmenes de homogenato de 1 ml, si en la dilución  $10^{-2}$  se contaron >300 colo-

nias y en  $10^{-3}$  se contaron 48 colonias el resultado es:

$$N = c / V \times d$$

Siendo "d" la dilución más alejada del homogenato y "c" el recuento de esa dilución.

$$N = 48 / 1 \times 10^{-3}$$

$$N = 48000 \text{ UFC/g}$$

**NOTA:** en el caso de que la dilución mayor de  $>300$  y la siguiente dilución de menos de 8 colonias el recuento se considera inválido. En caso de que la siguiente dilución de mayor a 8, utilizar el recuento de esa dilución.

**- Cuando todas las diluciones ofrecen conteos  $>300$  colonias el resultado se expresa como:**

$$N > 300 / d$$

Siendo d la dilución más alejada del homogenato.

**NOTA:** en caso de que no se puedan hacer los recuentos inmediatamente después de la incubación, las placas se pueden guardar en heladera por 48 h.

### Expresión final del resultado

En esta sección se describen los cálculos según las posibles superficies muestreadas, volúmenes o cantidades de muestra. Se desarrollan las fórmulas que tienen como finalidad independizar el cálculo del ejemplo particular, que puedan aplicarse y adaptarse a cualquier caso (como por ejemplo, las distintas superficies muestreadas).

Para el cálculo final y la expresión del resultado, deberá tenerse en cuenta lo siguiente:

- Sobre qué medida o parámetro desea expresarse la cantidad de UFC. Por ejemplo, UFC/g (UFC por unidad de masa de muestra).

- La cantidad de muestra tomada (puede ser en unidad de masa, volumen o superficie).

- La dilución generada al momento de preparar la muestra para su ensayo (homogenato).

- En caso de tratarse de esponjados o hisopados, la cantidad de diluyente con la que se hidrata el hisopo o esponja previo a la toma de muestra.

- Las diluciones seriadas realizadas previo a la inoculación en placa.

### Caso 1: Muestra de superficie

$$N_1 = N_0 \times V_2 / V_1$$

Donde:

$N_1$ : cantidad de microorganismos en la muestra tomada.

$N_0$ : resultado del recuento (contemplando las diluciones decimales).

$V_1$ : volumen de siembra.

$V_2$ : volumen de diluyente utilizado para la hidratación previa (contemplar el volumen de diluyente utilizado para hidratar el hisopo o esponja previo a la toma).

Para un esponjado de media res de 300 cm<sup>2</sup>, donde la esponja estaba previamente hidratada con 10 ml de diluyente, y posterior a la toma, se hidrata con 15 ml más (en el laboratorio). El resultado en placa para el recuento de *E. coli* fue de 48 UFC (en la placa se sembró 1 ml directamente desde el homogenato).

N<sub>0</sub>: 48 UFC.

V<sub>1</sub>: 1 ml.

V<sub>2</sub>: 25 ml (15 ml + 10 ml previos a la toma).

Superficie: 300 cm<sup>2</sup>.

$$N_1 = 48 \text{ UFC} \times 25 \text{ ml} / 1 \text{ ml} = 1200 \text{ UFC}$$

En este caso se puede expresar como 1200 UFC/300 cm<sup>2</sup>.

### Caso 2: Expresión por unidad de superficie

$$N_2 = N_1 / \text{superficie muestreada}$$

En este caso, se debe dividir el número de microorganismos cuantificados en el total de la superficie muestreada, por el tamaño de esta, siendo:

N<sub>1</sub>: cantidad de microorganismos en la muestra tomada

N<sub>2</sub>: cantidad de microorganismos por unidad de superficie

Superficie muestreada: 300 cm<sup>2</sup>

$$N_2 = 1200 \text{ UFC} / 300 \text{ cm}^2 = 4 \text{ UFC/cm}^2$$

En este caso se puede expresar como 4 UFC/cm<sup>2</sup>.

### Caso 3: Expresión por unidad de masa

$$N = N_0 \times 1/d$$

donde:

N: UFC/g en la muestra.

N<sub>0</sub>: resultado del recuento (contemplando las diluciones decimales).

D: dilución efectuada en la hidratación de la muestra.

El resultado se expresa por unidad de muestra en gramos. En este ejemplo la cantidad de muestra a analizar es de 10 g, y se hidrató con 90 ml de diluyente. El resultado en placa para el recuento de *E. coli* fue de 48 UFC (en la placa se sembró 1 ml directamente desde el homogenato).

Entonces:

N<sub>0</sub>: 48 UFC

d: 1/10 (se toman 10 g de muestra, y al agregarse 90 ml de diluyente, se considera una masa total de 100 g. Por lo tanto, la relación entre la muestra y la masa total del homogenato es 1/10).

$$N = 48 \times 1/(1/10) = 48 \times 10 = 480 \text{ UFC/g}$$

## E. CONTROL DE CALIDAD

#### - Control de esterilidad

Una vez por día se efectúa un control de esterilidad sembrando 1 ml del diluyente, utilizado para la siembra, en una placa para recuento del microorganismo a ensayar. Este control se registra con número de lote del diluyente utilizado y en el caso de obtener crecimiento bacteriano se toman acciones correctivas que incluyan por ejemplo la anulación de los ensayos afectados y la repetición de estos.

### - Control de calidad del ensayo

A) Correlación entre recuento de bacterias aerobias totales, Enterobacterias, coliformes totales, *E. coli* y *Staphylococcus*.

Todas las muestras que incluyan homogéneos compartidos para estas determinaciones, se utilizan para verificar la correlación de datos suponiendo los siguientes criterios que deben cumplirse en forma simultánea en el resultado final:

El valor de recuento de BAM será para todos los casos igual o mayor al recuento

de Enterobacterias, coliformes totales, *E. coli* y *Staphylococcus*. Por otro lado, la su-  
matoria del recuento de Enterobacterias y  
*Staphylococcus*, deberá ser menor o igual  
al recuento de BAM.

El valor de Enterobacterias será para todos los casos igual o mayor al de coliformes totales y *E. coli*.

El valor de coliformes totales será para todos los casos mayor o igual al de *E. coli* genérico.

En caso de que estos criterios no se cumplan para una determinada muestra, se repiten los tres ensayos utilizando la contramuestra respectiva.

REGISTROS

Con el fin de poder demostrar la trazabilidad de todas las etapas del proceso de análisis, los datos deberán ser registrados en un formulario de registro, vinculado a cada determinación. Lo ideal es confeccionar un registro para cada tipo de determinación. A continuación se presenta un modelo:

En **resultado obtenido** se registra el número de colonias cuantificadas para cada una de las diluciones realizadas.

NOTA: Para casos como los de recuentos de *E. coli* y coliformes totales, que pueden realizarse en la misma metodología,

se debe aclarar en el campo de “**Resultado obtenido**”, las colonias contabilizadas para cada microorganismo por separado.

NOTA: Los registros también pueden ser digitales siempre que se pueda demostrar la correspondiente trazabilidad asociada.

# **CAPÍTULO VIII**

## **DETECCIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS EN CARNE BOVINA**

*Victoria Brusa<sup>1</sup>, Magdalena Costa<sup>1</sup> y Jessica Babich<sup>2</sup>*

1. Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP, IGEVET - Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N. Dulout" (UNLP-CONICET LA PLATA), La Plata, Argentina.
2. Departamento de Microbiología de los Alimentos, Coordinación de Calidad e Inocuidad de Alimentos de Origen Animal, DLA-DGLyCT, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa), Martínez, Buenos Aires, Argentina.

Las carnes rojas son un medio de cultivo excepcional para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos (Bantawa *et al.*, 2018). El tejido muscular está recubierto por sus fascias protectoras y las miofibrillas contenidas dentro del sarcolema. Cuando las reses son cuarteadas, gran parte de su protección inicial se pierde, facilitando la colonización de los microorganismos (Heredia *et al.*, 2014).

Todos los animales portan grandes cantidades de microorganismos en cuero pelaje, ubre, pezuñas y sistema digestivo, los cuales pueden ser transmitidos a las medianas reses durante el proceso de faena. Los restos de materia fecal del cuero y el contenido intestinal suelen contaminar el músculo, si el proceso de faena no se hace cuidadosamente. Por otra parte, las bacterias también pueden proceder del entorno de producción como pisos, paredes, mesadas, cuchillos y manos de los operadores en la planta de faena (Bosilevac *et al.*, 2015; Brusa *et al.*, 2019; Cap *et al.*, 2019).

Los problemas más graves de inocuidad en carne bovina y que afectan la salud del consumidor, desencadenan retiros de productos e involucran patógenos bacterianos (Abebe *et al.*, 2020). Los bovinos son reservorios de bacterias potencialmente patógenas, tales como *Escherichia coli* productor de toxinas Shiga (STEC), *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* (Heredia y García, 2018). Para el control de estas bacterias es necesario aplicar acciones preventivas en todas las etapas de la cadena “de la granja a la mesa”, de este modo se reduce el riesgo de enfermedades transmitidas por los alimentos (Lianou *et al.*, 2017).

Las metodologías oficiales para la búsqueda de bacterias patógenas en carnes se basan en una secuencia de pasos:



- Las etapas de enriquecimiento y tamizaje pueden realizarse tanto en laboratorios de plantas frigoríficas como en laboratorios externos debidamente acreditados.

- Las etapas de aislamiento y confirmación pueden realizarse en laboratorios de plantas frigoríficas especializados y en laboratorios externos debidamente acreditados.

- Las etapas de caracterización (fenotípica y genotípica) y subtipificación (fenotípica o genotípica) se realizan en laboratorios de referencia o investigación (CONICET, INTA, Universidades, INEI-ANLIS Malbrán).

En la Tabla 26, se presentan comparadas las metodologías descritas para *E. coli* O157:H7, STEC no-O157, *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*.

**Tabla 26. Metodologías ISO (UE), USDA (USA) y GB (China) para la búsqueda de *E. coli* O157, STEC, *Salmonella* y *L. monocytogenes* en carne.**

	ISO 16654:2001	ISO 13136	MLG 5C.03	ISO 6579-1	MLG 4.14	GB 4789.4	ISO 11290	MLG 8.13	GB 4789.30			
Microorganismo	<i>E. coli</i> O157	STEC y STEC O157, O111 O26, O45, O103, O111, O121 y O145	STEC O157, O26, O45, O103, O111, O121 y O145	<i>Salmonella</i>			<i>L. monocytogenes</i>					
Matriz	-Alimentos de consumo humano -Piensos	-Alimentos de consumo humano -Piensos -Muestras ambientales de áreas de producción y manipulación de alimentos	-Cárnicos y media res -Muestras ambientales	-Alimentos de consumo humano -Piensos -Muestras ambientales de áreas de producción y manipulación de alimentos	-Carne y Media res -Esponjas ambientales -Aves -Huevo pasteurizado -Siluriformes	-Alimentos	-Alimentos de consumo humano -Piensos -Muestras ambientales de áreas de producción y manipulación de alimentos	-Carnes rojas -Aves -Siluriformes -Productos de huevo listos para comer -Muestras ambientales	-Alimentos			
Pre-enriquecimiento				APB	CTS <sub>m</sub> <sup>5</sup>	APB	HF	UVM	LB <sub>1</sub>			
Temperatura y tiempo de incubación				34-38°C, 18±2 h	42±1°C, 15-24 h <sup>5</sup>	36±1°C, 8-18 h	30±1°C, 24-26 h	30±2°C, 20-26 h	30±1°C, 24 h			
Tamizaje					Sistema de Detección Molecular 3M o equivalente <sup>4</sup>							
Enriquecimiento	CTS <sub>m+n</sub> (20mg/l <sub>t</sub> )	-CTS <sub>m+n</sub> (16mg/l <sub>t</sub> ) <sup>1</sup> -APB <sup>2</sup>	CTS <sub>m</sub>	RVS	MKT <sub>Tn</sub>	RV	TT (Hajna)	TT	SC	Fraser	MOPS-BLEB	LB <sub>2</sub>
Temperatura y tiempo de incubación	41,5±1°C, 6 h y luego por 12-18 h adicionales <sup>3</sup>	37±1°C, 18-24 h	42±1°C, 15-24 h	41,5±1 °C, 24±3h	34-38°C, 24±3 h	42±0,5°C, 22-24 h	42±1°C, 18-24 h	36±1°C, 18-24 h	37±1°C, 22-26 h	35 ± 2°C, 18-24 h	30±1°C, 18-24 h	
Tamizaje		1°: PCR-TR para stx/eaе 2°: PCR-TR para serogrupo								Sistema de Detección Molecular 3M o equivalente <sup>4</sup>		
Aislamiento	SIM y siembra CT-SMAC y SMAC (o alternativo) -Picar 5 colonias de cada placa	SIM (a stx/eaе+) y/o siembra en TBX (o alternativo) -Picar 50 colonias	SIM y siembra en agar Rainbow modificado -Picar colonias características	XLD y otro selectivo a elección -Picar colonias características	BGS y DMLIA -Picar al menos 1 colonia características por placa	BS y XLD	ALOA y otro selectivo a elección a partir del HF y del Fraser -Picar colonias características	MOX	Listeria cromogénico y PALCAM			
Confirmación *	-Prueba de Indol (+) o identificación bioquímica con kit comercial -Aglutinación en látex o antisero	PCR stx/eaе o aglutinación para serogrupo (si corresponde)	1°: aglutinación a colonias típicas, si (+); 2°: PCR-TR para stx, eaе y serogrupo	Pruebas bioquímicas y serológicas	-Bruker® MALDI Biotyper o sistemas equivalentes validados	TSI, LIAr, Indol, Urea, KCN	-Aspecto microscópico -Beta-hemólisis -CAMP -Azúcares -Catalasa -Motilidad	-Tamizaje (-) y no crecimiento de colonias típicas en UVM-MOX: Muestra negativa - Tamizaje (-) y crecimiento de colonias típicas en UVM-MOX: continuar confirmación desde UVM-MOX -Tamizaje (+): siembra en agar selectivo desde el MOPS-BLEB y continuar confirmación desde UVM-MOX -Colonias típicas en UVM-MOPS-BLEB: continuar confirmación <sup>6</sup> -Siembra de colonias típicas en agar sangre equina	Xirosa (-) y ramnosa (+)			

	ISO 16654:2001	ISO 13136	MLG 5C.03	ISO 6579-1	MLG 4.14	GB 4789.4	ISO 11290	MLG 8.13	GB 4789.30
Caracterización	Enviar a laboratorio de referencia para caracterizaciones adicionales (opcional)	Enviar a laboratorio de referencia para caracterizaciones adicionales (opcional)	Pruebas bioquímicas Confirmación de AgO Genes stx/eae		Susceptibilidad antimicrobiana (AST) y secuenciación del genoma completo (WGS)	Test serológicos		Pruebas bioquímicas y genotípicas	

\*Siempre debe realizarse a partir de colonias puras.

1 se sugiere su utilización en muestras sospechosas de contener alta carga de flora contaminante.

2 se sugiere su utilización cuando se analizan muestras que se asume contienen bacterias estresadas (productos congelados).

3 incubación de 6 h seguida de SIM y siembra en agar selectivo. Repetir SIM luego de incubar 18 h adicionales.

4 si las circunstancias (p. ej., un corte de energía o una falla del equipo) no permiten realizar pruebas con el sistema de detección rápida, el laboratorio deberá, si es posible, continuar el análisis por aislamiento cultural de todas las muestras.

El tamizaje se hace a partir del caldo de pre-enriquecimiento.

5 para análisis de carne cruda y media res. Revisar la metodología en caso de analizar otra de las matrices para la cual está validada.

6 para una mejor comprensión de la metodología remitirse al texto del presente manual.

#### Interpretación de resultados ISO 13136:

- Presencia de STEC: stx (+).
- Presencia de STEC causante de lesión A/E: stx y eae (+).
- Presencia de STEC "X" serogrupos: stx, eae y serogrupo (+).

#### Interpretación de resultados MLG 5C.03

- STEC Positiva confirmada: stx y eae (+), gen de serogrupos (+) y bioquímicamente *E. coli*.

- *E. coli* O157 Positiva confirmada: Serológica y genéticamente "O157", bioquímicamente *E. coli* y además producción de toxina Shiga (+), y/o stx (+), y/o genéticamente H7.

- STEC negativa: stx, eae (+) o gen de serogrupos (-).

En este capítulo se abordan los siguientes componentes:

- A. *Escherichia coli* productor de toxinas Shiga (STEC).
- B. *Salmonella* spp.
- C. *Listeria monocytogenes*.
- D. Técnicas de *screening* o tamizaje para la detección de bacterias patógenas en alimentos.

**NOTA del editor:** los 3 géneros bacterianos son de gran importancia para la industria frigorífica. Sin embargo, el apartado sobre STEC se desarrolló con mayor detalle debido a la experiencia de las autoras y a los resultados obtenidos por el grupo de trabajo interdisciplinario “*Escherichia coli* productor de toxina Shiga del Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina (STEC-IPCVA)”.

## Factores de virulencia asociados a STEC y fisiopatogenia de las enfermedades asociadas

A diferencia de otras toxinas bacterianas, las toxinas Shiga no son preformadas en el alimento, sino que se sintetizan dentro del organismo del individuo tras la ingestión del alimento contaminado con STEC. Una vez que STEC ingresa al hospedador se desencadenan una serie de eventos que permiten la colonización bacteriana de las células y producción de la toxina. Para que esta cascada de eventos ocurra, las cepas STEC deben ser portadoras de algunos genes que codifican para factores involucrados en la colonización, toxinas e inmunomoduladores (Torres, 2016). En la Tabla 27 se presentan algunos de los factores de virulencia asociados a cepas de STEC.

### A. *Escherichia coli* productor de toxina Shiga

*Escherichia coli* productor de toxina Shiga (**STEC**) es un patógeno transmitido por alimentos que se caracteriza por la habilidad de producir potentes citotoxinas denominadas **toxinas Shiga**, con capacidad de inhibir la síntesis proteica en células eucariotas. Las toxinas Shiga están codificadas en los **genes stx**. Las cepas de STEC se diferencian serológicamente por sus antígenos. Hasta el presente se identificaron más de 185 antígenos O y alrededor de 80 antígenos H (Iguchi *et al.* 2015, 2016).

**Tabla 27.** Factores de virulencia de STEC.

FACTORES DE ADHERENCIA QUE FACILITAN LA UNIÓN DE LA BACTERIA A LA CÉLULA	GEN/OPERÓN
Intimina*	eae
Sistema de secreción de tipo III*	sep, esc
EspA, EspB, EspD*	espA, espB, espD
Tir*	tir
LPF ( <i>long polar fimbriae**</i> )	lpf1, lpf2
P1 (fimbria tipo 1)	fim
Iha ( <i>iron regulated gene A homologue adhesin**</i> )	iha
Efa1 ( <i>EHEC factor for adherence**</i> )	efa-1
Saa ( <i>STEC autoagglutinating adhesin**</i> )	saa
Sfp ( <i>sorbitol fermenting plasmid**</i> )	spf
ToxB (proteína identificada en pO157)	toxB
<b>Toxinas que producen daño celular</b>	
Stx1 ( <i>Shiga-toxin 1**</i> )	stx1
Stx2 ( <i>Shiga-toxin 2**</i> )	stx2
CDT-V ( <i>cytotoxic distending toxin**</i> )	cdt-V
SubAB ( <i>subtilase cytotoxin**</i> ),	subAB
EAST1 ( <i>enteroaggregative E. coli heat-stable toxin 1**</i> )	astA
Enterohemolisina	ehxA o hlyA
<b>Otros</b>	
AaiC (proteína secretada por EAEC)	aaiC
AggR ( <i>plasmid-encoded regulator**</i> )	aggR

\* Isla de patogenicidad LEE (*locus for enterocyte effacement*)

\*\* por sus siglas en inglés

Los genes de virulencia se encuentran heterogéneamente distribuidos entre las cepas de STEC y sólo una subpoblación de estas cepas fue asociada con las formas más severas de enfermedad (**síndrome urémico hemolítico**). El receptor Tir, codificado en la isla de patogenicidad LEE, es introducido a la célula intestinal del hospedador por un sistema de secreción propio de la bacteria. Este receptor se expone en la superficie de las células intestinales del hospedador como receptor de **Intimina** (principal adhesina de STEC, codificada en el **gen eae**), favoreciendo la unión íntima entre la bacteria y la célula. Consecuencia de esta unión, se produce

la lesión A/E (*attaching and effacing*), que consiste en un reordenamiento del citoesqueleto de la célula hospedadora con reducción de la superficie de absorción y la consecuente diarrea sin sangre. Sin embargo, en otros la adhesión puede estar mediada por otras adhesinas putativas. Otras cepas sólo contienen una parte del genoma de virulencia y pocas veces fueron asociadas a enfermedad severa a pesar de poseer los genes stx. La variabilidad en la virulencia, incidencia y severidad de las infecciones producidas por los diferentes serotipos de STEC, no puede ser atribuido exclusivamente a los factores de virulencia presentes, sino también a la expresión de

dichos genes de virulencia, la interacción del patógeno con factores del hospedador y el ambiente y a la dosis infectiva.

### Epidemiología del síndrome urémico hemolítico (SUH)

El SUH se caracteriza por la tríada de anemia hemolítica microangiopática no inmune, trombocitopenia y disminución de la función renal. El SUH se clasifica según su etiología en: 1) SUH infeccioso, causado principalmente por STEC (STEC-SUH) y en menor proporción por otros microorganismos (*Streptococcus pneumoniae*, influenza); y 2) SUH atípico, por desregulación de la vía alternativa del sistema del complemento o independiente del complemento (mutación de cobalamina C, mutaciones), SUH con enfermedad coexistente (traspante, trastornos autoinmunes, fármacos, hipertensión maligna, cáncer o quimioterapia) y SUH idiopático (Loirat *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2022).

STEC es un patógeno transmitido por los alimentos asociado con diarrea leve, colitis hemorrágica, trombocitopenia y SUH (JEMRA, 2018). En el período 1998-2016, los alimentos asociados con

casos de STEC fueron: carne bovina (2,6-18,2%), vegetales (10,8-15,6%), lácteos (5,5-8,57%) y otros alimentos (5,1-10,3%). Sin embargo, el 54-65,7% de los casos de STEC notificados en el mundo no pudieron atribuirse a un origen alimentario (JEMRA, 2018). Asimismo, se identificaron como factores de riesgo viajar al extranjero, estar en contacto con personas enfermas y animales de granja, estar expuesto a aguas no tratadas y ambiente contaminado, y la transmisión persona-persona (EFSA-BIO-HAZ Panel 2020; Augustin *et al.*, 2021).

La información disponible sobre los casos de SUH en el mundo es escasa y se limita a datos de enfermedad por STEC y estimaciones sobre la población (Majowicz *et al.*, 2014). Los datos epidemiológicos disponibles no discriminan los casos de SUH de otras enfermedades causadas STEC (diarrea, diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica), lo que dificulta la interpretación y comparación de la información (Kirk *et al.*, 2015; JEMRA 2018). Además, los sistemas de vigilancia epidemiológica difieren entre países, con la consiguiente variabilidad en la forma de presentar la información de los casos de STEC-SUH (Tabla 28).

**Tabla 28.** Incidencia de SUH en diferentes países por cada 100.000 personas totales y cada 100.000 niños menores de 5 años.

PAÍS	INCIDENCIA		REFERENCIA
	100.000 personas	100.000 niños < 5	
Nueva Zelanda	0,8	2,6	Annual Report Concerning Foodborne Diseases in New Zealand 2020
Argentina	0,6	5,95	BEN 611, 2022
China	0,57	0,38	Feng <i>et al.</i> , 2022
Irlanda	0,54	-	Annual Epidemiological Report for VTEC Infection
Francia	0,49	3,1	ECDC 2019
Bélgica	-	4,5	Jacquinet <i>et al.</i> , 2018
Estados Unidos	-	1,4	CDC <a href="https://www.cdc.gov/foodnetfast/HUS">https://www.cdc.gov/foodnetfast/HUS</a>

-: sin notificación

Las infecciones causadas por cepas de STEC poseen carácter zoonótico y el ganado bovino fue reportado como el principal reservorio animal de este grupo bacteriano (Kim *et al.*, 2020). En los frigoríficos, STEC puede transferirse a la superficie de la res en cualquier etapa del procesamiento por contaminación cruzada entre producto, equipos, herramientas y operarios (Bosilevac *et al.*, 2015; Brusa *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2020; Dickson y Acuff, 2017). En Argentina, STEC y/o stx fueron reportados en cueros y medias reses bovinas, cortes cárnico, recortes, carne molida y ambiente de frigorífico (Etcheverria *et al.*, 2010; Baeza *et al.*, 2013; Brusa *et al.*, 2017; Cap *et al.*, 2018; Brusa *et al.*, 2019; Brusa *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2020). Sin embargo, la detección de stx o el aislamiento de cualquier cepa STEC en el ganado, la carne o el ambiente en contacto con ella no son suficientes para predecir el riesgo para la salud asociado con el consumo de carne (JEMRA, 2022). En este sentido, el análisis de riesgo fue aceptado internacionalmente como una secuencia lógica de pasos para estimar los riesgos para la salud humana, identificar e implementar medidas apropiadas de gestión y comunicación de riesgo basadas en evidencia científica (Nakashima *et al.*, 2021).

### Evaluaciones cuantitativas de riesgo e intervenciones en productos cárnico

El **análisis de riesgo** consiste en una secuencia lógica de pasos para estimar el riesgo de un determinado peligro para la salud humana, e identificar, implementar y comunicar medidas de gestión de riesgos basadas en evidencia científica. El análisis de riesgos consta de tres componentes: evaluación de riesgos, gestión de riesgos, y comunicación de riesgos.

La **Evaluación de riesgos** es un proceso basado en evidencia científica cuyo objetivo es estimar la probabilidad y severidad de la exposición a un determina-

do peligro atendiendo a las incertidumbres propias del proceso. En este proceso se incluye:

**a) Análisis de sensibilidad:** procedimiento para cuantificar la influencia que las variables incluidas en el modelo ejercen sobre el resultado. Es posible identificar las variables que producen mayor o menor impacto y sobre las cuales se podrían aplicar acciones.

**b) Análisis de escenarios:** se realiza luego del análisis de sensibilidad con el objetivo de modelar el efecto de la aplicación de potenciales medidas de control permitiendo estimar la magnitud del cambio en el resultado (León y Signorini, 2020).

En Argentina, en los últimos 3 años se publicaron varios trabajos basados en evaluaciones de riesgo de SUH asociado al consumo de carne bovina:

**1) Evaluación de riesgo de SUH asociado con el consumo de carne bovina en Argentina (Brusa *et al.*, 2020).** En este trabajo se demostró que se esperarían 32 casos anuales de SUH en Argentina. Asimismo, se encontraron diferencias según el tipo de producto cárnico consumido por la población bajo estudio ( $\leq 15$  años de edad):

**a) Cortes de carne bovina:** no se esperarían casos de SUH debido al consumo de cortes cárnico. Cabe destacar que según la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud de Argentina (MINSAL 2012), los cortes de carne bovina fueron el alimento cárnico más consumido por la subpoblación más susceptible (niños menores de 1 año).

**b) Hamburguesas comerciales:** se esperarían 4 casos anuales de SUH.

**c) Carne molida:** se esperarían 28 casos anuales de SUH.

**Del análisis de sensibilidad** de esta evaluación de riesgo se concluye:

- La probabilidad de SUH es 1,2 veces mayor si la carne molida es elaborada con carne proveniente de frigoríficos que no implementan un plan de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) o no consideran a STEC como un peligro en su APPCC (APPCC-STEC). Por lo tanto, la aplicación de APPCC identificando a STEC como un peligro (APPCC-STEC) en todos los frigoríficos podría ayudar a reducir la incidencia del SUH.

- La ausencia de Procedimientos Operativos Estándar de Saneamiento (POES) y Buenas Prácticas de Higiene (BPH) y de Manufactura (BPM) en las carnicerías y en el hogar aumentan el riesgo de SUH.

- La preferencia respecto al grado de cocción de la carne por los consumidores argentinos fue identificada como variable protectora respecto al riesgo de SUH. Sin embargo, esta variable no debe ser considerada como la eventual solución a la no aplicación de APPCC en frigoríficos, y POES, BPM y BPH en carnicerías y en el hogar.

## **2) Análisis de escenarios para reducir la probabilidad de adquirir SUH asociado al consumo de carne bovina (Costa et al., 2021)**

Antes de avanzar con el análisis de escenarios, consideramos conveniente analizar lineamientos generales respecto de la aplicación de intervenciones tendientes a reducir la presencia de STEC en carne bovina.

**La aplicación de intervenciones en frigoríficos que cuentan con APPCC** puede ayudar a reducir significativamente la carga de bacterias patógenas en las reses (Signorini et al., 2018). Sin embargo, una sola intervención en alguna de las etapas de la cadena productiva no es suficiente

para eliminar los patógenos de manera confiable y completa de las superficies de la carne (Buncic et al., 2014). En el período 2013-2020, se evaluaron y validaron varias intervenciones para reducir la adherencia bacteriana en diferentes etapas de la cadena de producción en frigoríficos comerciales: ácidos orgánicos, agua caliente, vacío de vapor, ácido hipocloroso generado electrolíticamente (EGHA), ozono (acuoso y gaseoso) e intervenciones combinadas (Signorini et al., 2018; Casas et al., 2021; Vargas et al., 2021; Brusa et al., 2019).

### **Consideraciones para la aplicación de intervenciones en frigoríficos:**

- Las intervenciones sólo pueden ser aplicadas en frigoríficos con APPCC.
- No se deben utilizar intervenciones para enmascarar malas prácticas en el proceso productivo.
- Aplicar intervenciones aprobadas por la autoridad sanitaria, como así también por la Organización Mundial de la Salud (OMS).
- Validar las intervenciones según un estándar internacional.
- Se recomienda acompañar las intervenciones con otras acciones, tales como verificación de las características microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales del producto; monitoreo ambiental; y controles periódicos realizados por la autoridad sanitaria, gubernamental o competente.

Diferentes escenarios fueron simulados para evaluar el efecto de las intervenciones sobre la probabilidad de SUH por consumo de carne bovina molida y hamburguesas comerciales. Para ello se utilizó como modelo basal la evaluación de riesgo de SUH por consumo de carne en Argentina y los resultados de intervenciones probadas en la industria frigorífica del país (Brusa et al., 2020). A continuación, se enumeran las principales conclusiones del estudio:

- Mejorar las prácticas de higiene en los frigoríficos que no aplican APPCC-STEC reduciría 7,6 veces la probabilidad que los consumidores adquieran SUH por el consumo de carne molida, resultando en una reducción de 28 a 6 casos.

- Aplicar BPH y BPM en carnicerías que no lo aplican, reduciría 2,8 veces el riesgo de SUH por consumo de carne molida, logrando una reducción de 28 a 22 los casos.

- Aplicar ácido láctico al 2% y agua caliente en medias reses implicaría un riesgo 4,5 y 3,5 veces menor de desarrollar SUH por consumo de hamburguesas comerciales, logrando una reducción de 4 a 1 casos.

- Aplicar dosis bajas de irradiación en hamburguesas comerciales reduciría 93,1 veces la probabilidad de adquirir SUH por hamburguesas, obteniendo una reducción de 4 a 0 casos.

### **3) Evaluación cuantitativa de riesgo de SUH asociado a carne Kosher producida en Argentina y consumida en Israel (Brusa et al., 2023)**

En este artículo la población bajo estudio fueron niños menores de 14 años de Israel. El resultado fue que en Israel se esperarían 0 casos anuales de SUH por STEC debido al consumo de carne bovina Kosher producida en Argentina.

La diferencia en número de casos esperados estimado por la evaluación sobre la población argentina e israelí podría estar determinada por el proceso productivo aplicado en cada caso. La información utilizada en el modelo para consumidores israelíes se obtuvo de frigoríficos de exportación que aplican APPCC, identifican a STEC como peligro y exportan carne envasada al vacío (Brusa et al., 2023). En cambio, en el modelo de Argentina se consideraron todos los frigoríficos que producen carne para consumo interno (con y sin

APPCC), y se incluyó el procesamiento en boca de expendio minorista.

### **Consideraciones sobre las evaluaciones de riesgo de SUH por consumo de carne bovina.**

En Argentina, se podría reducir el 10% de los casos de SUH si se implementara un único **estándar sanitario para todos los frigoríficos argentinos** (incluyendo APPCC) y se aplicaran POES, BPH y BPM en las carnicerías y los hogares.

Asimismo, los casos anuales de SUH estimados por el modelo de riesgo y asociados al consumo de hamburguesas comerciales se reducirían a 0 tras aplicar radiación gamma (Costa et al., 2021).

Si bien la aplicación de estas medidas sería un gran avance para el conjunto de casos de esta enfermedad, es necesario seguir trabajando para reducir el 90% de casos que no estarían directamente asociados al consumo de carne bovina.

### **Detección y aislamiento de STEC en alimentos**

Cuando STEC está presente en un alimento suele encontrarse en baja carga, por lo tanto, el enriquecimiento de muestras de alimentos es un paso indispensable para detectar STEC en carne, lácteos y otros alimentos.

La combinación de enriquecimientos selectivos seguidos de métodos rápidos de detección (tamizaje), permiten reducir el tiempo de procesamiento y mejorar la sensibilidad. La aplicación de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que identifican genes de virulencia son, en general, altamente sensibles y específicos para la detección de STEC (JEMRA, 2022). Las técnicas de tamizaje actualmente disponibles para STEC, se dirigen a detectar los **genes stx** que codifican la expresión de las toxinas

Shiga y el **gen eae** que codifica la expresión de Intimina. Sin embargo, además de STEC, otras bacterias pueden ser portadoras de los mismos genes de virulencia y la detección de genes por sí sola no implica un riesgo real para la salud (JEMRA, 2022).

El aislamiento de STEC por métodos tradicionales basados en cultivos, incluyendo la separación inmunomagnética (SIM), es fundamental para confirmar muestras positivas en un tamizaje. Si bien, las técnicas de SIM mejoran el aislamiento de STEC, solo están disponibles para los principales serogrupos *eae* positivos: O157, O145, O121, O111, O103, O26, O45. En este contexto, es necesario considerar que luego del aislamiento utilizando SIM, se requieren análisis de PCR adicionales para identificar genes *stx* que permitan confirmar la presencia de STEC en la cepa aislada.

## Caracterización de STEC en alimentos

Cada metodología específica (ISO, MLG, CAA) tienen un esquema de caracterización definido. En caso de dudas es posible determinar la multiplicidad de factores de virulencia presentados en la tabla 27. La caracterización completa de los aislamientos de STEC no se realiza de rutina y menos aún en un laboratorio de planta frigorífica. Sin embargo, es importante considerar que el grupo de expertos en evaluación de riesgos de la OMS y la FAO (JEMRA) recomendaron caracterizar los subtipos *stx<sub>1</sub>* y *stx<sub>2</sub>*, ya que algunos subtipos se asocian más frecuentemente con enfermedad grave (JEMRA, 2022). En la reunión de JEMRA sobre STEC en 2017, se propuso definir el riesgo para la salud en función de los genes de virulencia (variantes *stx*, *eae* y *aggR*) y no de los serotipos (Tabla 29) (JEMRA, 2018). En Argentina, este esquema de caracterización solo puede realizarse en el Laboratorio Nacional de Referencia (ANLIS-Malbrán) y se podría utilizar en alimentos asociados con casos o brotes epidémicos de enfermedad causada por STEC.

**Tabla 29.** Combinaciones de genes de virulencia de STEC y potencial estimado para causar diarrea (D), diarrea sanguinolenta (DS) y síndrome urémico hemolítico (SUH<sup>1</sup>) (JEMRA, 2018).

NIVEL	GEN	POTENCIAL PARA CAUSAR
1	<i>stx</i> <sub>2a</sub> + <i>eae</i> o <i>aggR</i>	D/DS/SUH
2	<i>stx</i> <sub>2d</sub>	D/DS/SUH <sup>2</sup>
3	<i>stx</i> <sub>2c</sub> + <i>eae</i>	D/DS <sup>3</sup>
4	<i>stx</i> <sub>1a</sub> + <i>eae</i>	D/DS <sup>3</sup>
5	Otros subtipos <i>stx</i>	D

<sup>1</sup> Dependiendo de la susceptibilidad del huésped u otros factores; p.ej. tratamiento antibiótico

<sup>2</sup> Asociación con SUH dependiente de la variante *stx*<sub>2d</sub> y antecedentes de cepa.

<sup>3</sup> Se informó que algunos subtipos causan DS y, en raras ocasiones, SUH

## Metodologías para la búsqueda de STEC en alimentos

De acuerdo con JEMRA (2022), la exportación de alimentos a los diferentes mercados debería estar certificada como libre de STEC O157:H7 y no-O157. Sin embargo, JEMRA es un grupo de expertos que emiten recomendaciones y actualmente **no existe un consenso entre los diferentes países respecto a los criterios de exigencia para STEC en carne bovina**. Incluso, en algunos destinos, como en la Unión Europea, no existe un marco regulatorio específico. Tanto los criterios a aplicar como los análisis a realizar son determinados por cada Puerto de Inspección Fronteriza (PIF). Si analizamos la información disponible en el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF), podemos encontrar análisis de cortes cárnicos congelados con resultado informado como

presencia de STEC/25 g (<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search>).

En estos casos no está especificado si se aisló alguna cepa de STEC a partir de la muestra, y menos aún la caracterización de la cepa (*eae*, variante de toxina Shiga). Sin embargo, en ambos ejemplos se aplicaron acciones posteriores de rechazo en puerto de inspección fronteriza o *recall* en boca de expendio, considerando que los alimentos implicados representan un riesgo grave. Otros países establecieron criterios claros referidos a la búsqueda de STEC O157 y no-O157 en carne y otros alimentos (Tabla 30). Cada normativa establece con qué metodología debe llevarse a cabo el análisis microbiológico.

**Tabla 30.** Criterios microbiológicos que incluyen *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en productos cárnicos bovinos comparados según destino.

DESTINO	MATRIZ	MICROORGANISMO	PLAN DE MUESTREO		LÍMITE	NORMA	METODOLOGÍA EN SU VERSIÓN MÁS ACTUAL
			N	C			
Argentina <sup>1</sup>	Carne picada fresca	<i>E. coli</i> O157:H7/NM	5	0	Ausencia en 65 g	Art 255 CAA	ISO 16654 USDA-FSIS
		STEC no O157 (O26, O103, O111, O145 y O121)					ISO 13136 USDA-FSIS
	Salazones cocidas	<i>E. coli</i> O157:H7/NM	5	0	Ausencia en 65 g	Art 286bis CAA	USDA FSIS ISO 16654 BAM-FDA
	Chacinados embutidos frescos y cocidos	<i>E. coli</i> O157:H7/NM	5	0	Ausencia en 65 g	Art 302 CAA	USDA FSIS ISO 16654 BAM-FDA
		STEC no-O157 (O26, O103, O111, O145 y O121)	5	0	Ausencia en 65 g		ISO 13136 BAM-FDA USDA-FSIS
	Chacinados no embutidos frescos	<i>E. coli</i> O157:H7/NM	5	0	Ausencia en 65 g		USDA FSIS ISO 16654 BAM-FDA
		STEC no-O157 (O26, O103, O111, O145 y O121)	5	0	Ausencia en 65 g		ISO 13136 BAM-FDA USDA-FSIS
Canadá	Recortes y cortes para elaboración de productos cárnicos	<i>E. coli</i> O157:H7 y <i>E. coli</i> O157:NM	60 <sup>2</sup>	0	Ausencia en 325 g ± 32,5 g	Government of Canada. Preventive controls for <i>E. coli</i> O157/NM in raw beef products	Laboratory Procedures for the Microbiological Analysis of Foods. MFLP-76
	Carne picada	<i>E. coli</i> O157:H7 y <i>E. coli</i> O157:NM	5	0	Ausencia en 65 g		
China	Cortes cárnicos	<i>E. coli</i> diarreogénicas incluyendo O157:H7	5	0	Ausencia	GB-T 17238	GB-T 4789.6
Israel	Carne bovina	STEC O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157	5	0	Ausencia en 25 g	Requirements 170419	ISO 13136
Unión Europea	No existe normativa específica para <i>E. coli</i> O157:H7 ni para STEC no-O157 en productos cárnicos. Sin embargo, en algunos PIF realizan análisis sobre 5 muestras de 25 g cada una y el criterio es tolerancia cero a cualquier STEC (principio de cautela), sin importar el serotipo ni la detección del gen eae. Siempre se debe confirmar el resultado a partir de un cultivo puro de STEC.						
USA	Carcasas y esponjas ambientales	STEC O157, O26, O45, O103, O111, O121 y O145	1	0	Ausencia en 1 esponja		MLG5C
	Cortes y recortes importados para elaboración de productos cárnicos		60 <sup>2</sup>	0	Ausencia en 325 g ± 32,5 g (FSIS Directive 10010.1 Rev 5)	MT513	
	Carne picada importada			0	Ausencia en 325 g ± 32,5 g (FSIS Directive 10010.1 Rev 5)	MT084	

Rusia, Brasil y Chile no incluyen STEC en su normativa reglamentaria.

<sup>1</sup>- Se recomienda complementar la información con el anexo 2 (capítulo V de este manual), en la que se comparan las Circulares Senasa.

<sup>2</sup>- En lotes con independencia microbiológica y de hasta 4.500 Kg.

<sup>3</sup>- STEC Sampling of Imported Raw Beef Products Video training.

<sup>4</sup>- El muestreo se hace completando 3 bolsas hasta la línea de llenado que se encuentra en la misma.

En este capítulo analizaremos las metodologías oficiales de la Unión Europea (ISO) y de USA (USDA-MLG) para STEC O157:H7 y STEC no-O157. Describiremos las etapas de las metodologías que se podrían aplicar en un laboratorio de planta frigorífica: enriquecimiento, tamizaje, separación inmunomagnética y eventualmente aislamiento y confirmación.

## ISO 16654

Microbiología de alimentos y alimentos para animales-Método horizontal para la detección de *Escherichia coli* O157.

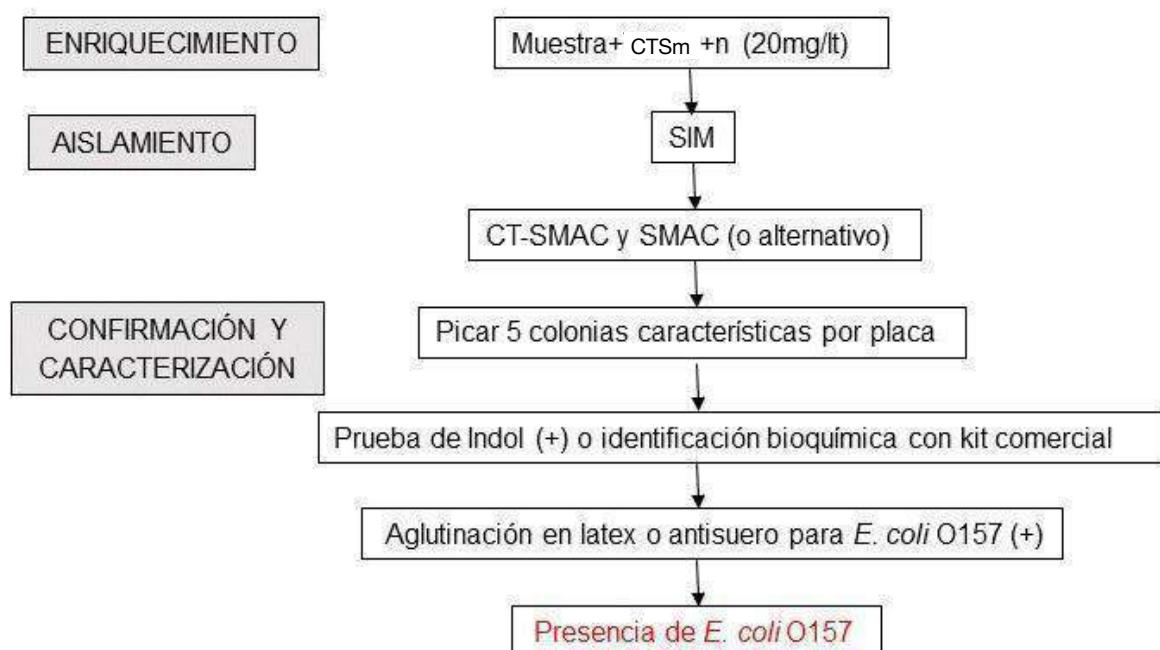
- **Enriquecimiento:** en caldo Trypticasa Soya modificado (CTS<sub>m</sub>) con 20 mg L<sup>-1</sup> de novobiocina (CTS<sub>m</sub>+20), aprovechando la capacidad de *E. coli* O157 para crecer con concentraciones superiores de novobiocina respecto a otros serogrupos. Tempera-

tura y tiempo de incubación: 41,5±1°C durante 18-24 h.

- **Aislamiento:** luego de la incubación se realiza la SIM y posterior siembra en agar MacConkey sorbitol con cefixima y telurito (CT-SMAC) y en SMAC o alternativo. Se utiliza CT-SMAC dada la capacidad de *E. coli* O157:H7 de crecer en presencia de cefixima y telurito de potasio y de su incapacidad de fermentar sorbitol, lo que permite identificar las colonias. Las placas son incubadas a 37°C por 18-24 h y de las mismas, se seleccionan 5 colonias características.

- **Confirmación:** a partir de colonias puras, se realiza la prueba de indol y la aglutinación en látex o con antisuero, siempre sobre colonias indol positivas (Tabla 26).

### Flujograma ISO 16654



## ISO 13136

Microbiología de alimentos y piensos. Método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para la detección de patógenos transmitidos por los alimentos. Método horizontal para la detección de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) y la determinación de serogrupos O157, O111 O26, O103 y O145.

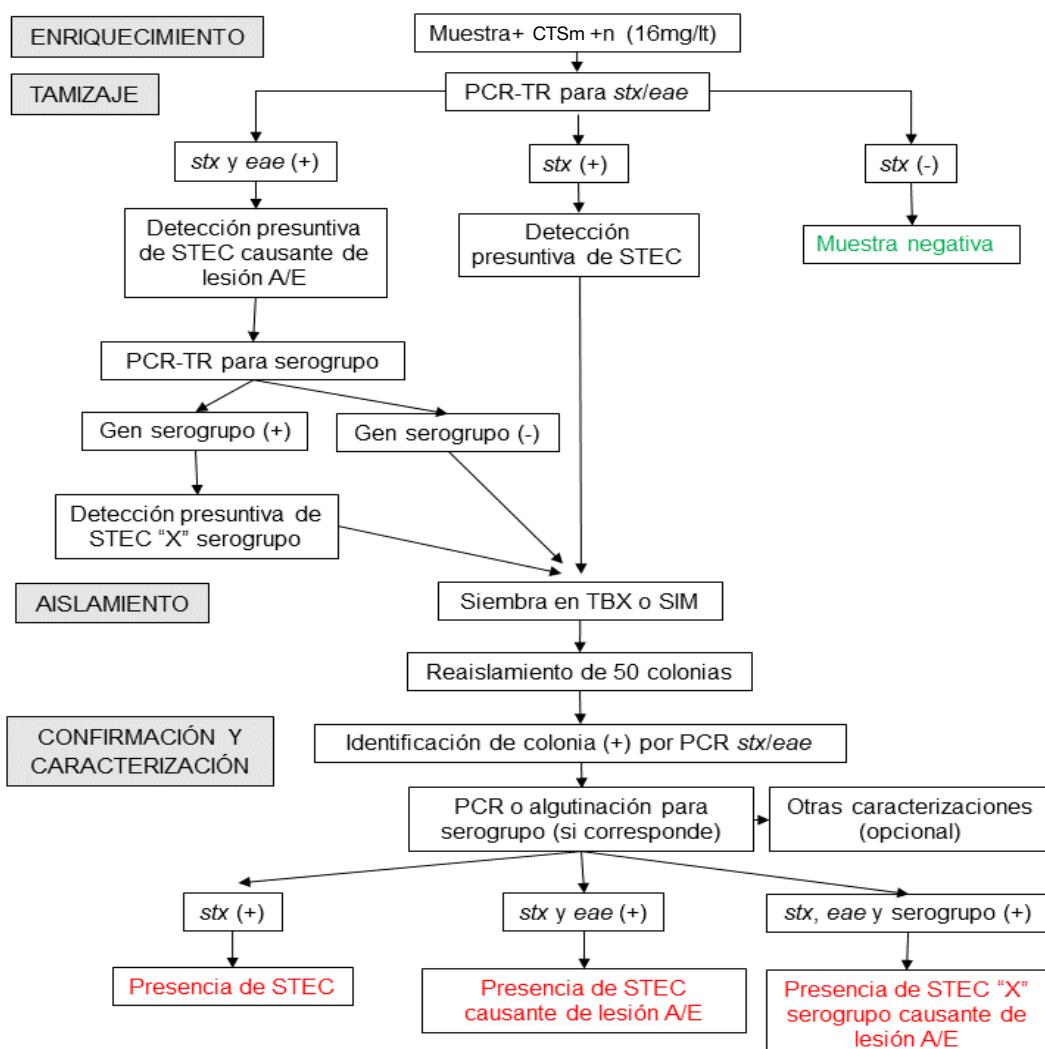
- **Enriquecimiento:** en CTSm con 16 mg L<sup>-1</sup> de novobiocina (CTSm+16), en muestras sospechosas de contener alta carga de flora contaminante, y de agua peptonada bufferada (APB) cuando se analizan muestras que se asume contienen bacterias estresadas (productos congelados).

Temperatura y tiempo de incubación: 37+/- 1°C durante 18-24 h.

- **Tamizaje:** luego de la incubación se realiza un tamizaje por PCR Tiempo Real (TR) para la detección de los genes *stx* y *eae*.

- **Aislamiento:** en agar cromogénico TBX u otro medio selectivo específico aplicando la técnica de SIM, en caso de estar disponible esta posibilidad según el serogrupo identificado. Se deben seleccionar 50 colonias con aspecto o morfología característicos de *E. coli*, a las que se les realizará PCR para detectar los genes *stx/eae* o aglutinación para serogrupo (en caso de corresponder) (Tabla 26).

### Flujograma ISO 13136



## **USDA MLG 5C.03**

Aislamiento e identificación de STEC TOP SEVEN (O157, O26, O45, O103, O111, O121 y O145) en productos cárnicos, medias reses y muestras ambientales.

- **Enriquecimiento:** en CTSm. Temperatura y tiempo de incubación: 42±1°C durante 15-24 h.

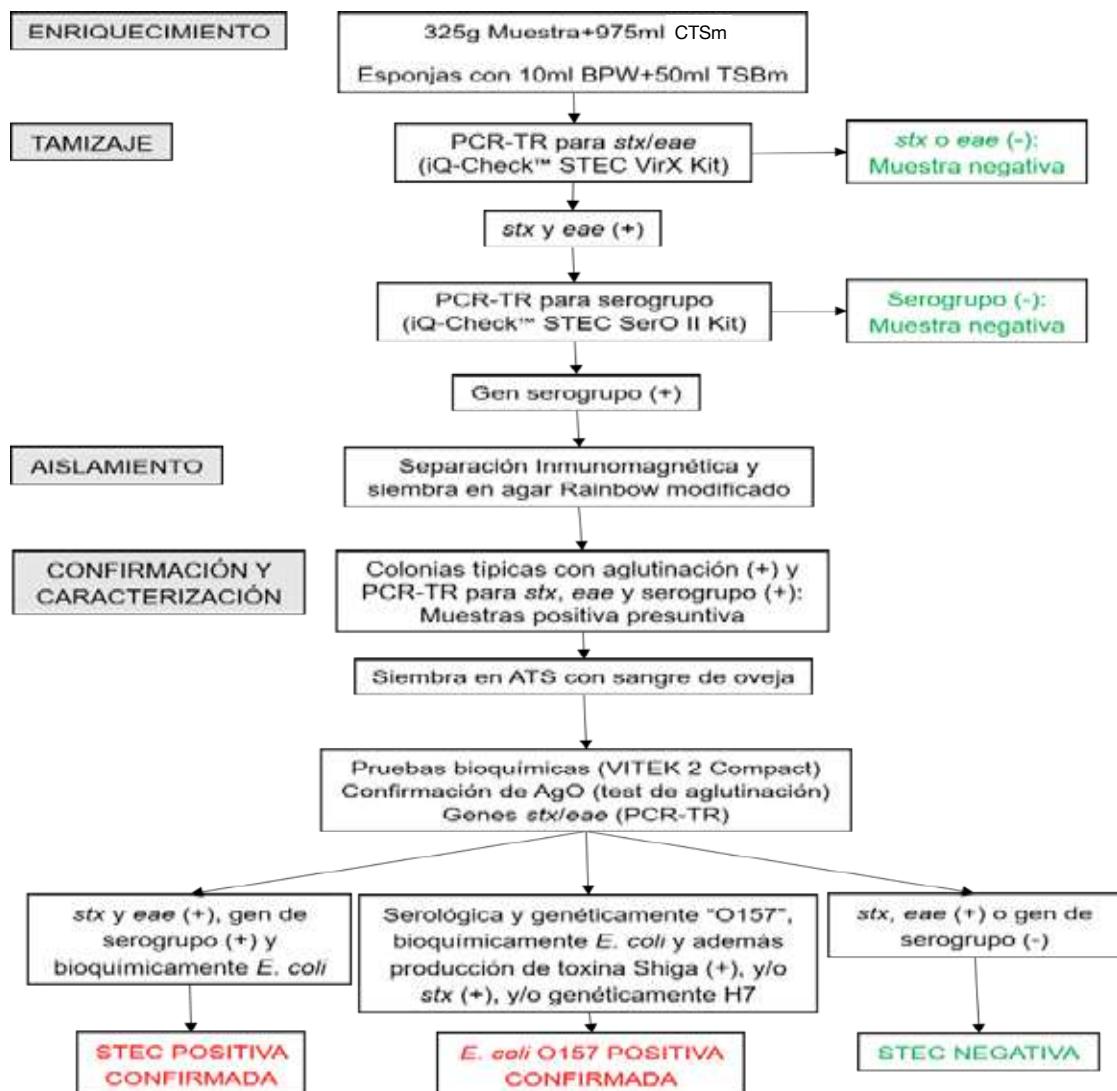
- **Tamizaje:** por una PCR-TR para la detección de los genes *stx* y *eae*. Si bien la norma menciona el kit iQ-Check™ STEC VirX (Bio-Rad Laboratories), pueden utilizarse otros métodos de detección aprobados por USDA ([https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media\\_file/2020-09/Validated-Test-Kit.pdf](https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2020-09/Validated-Test-Kit.pdf)). Aquellas muestras con señal negativa para *stx/eae* se informan como “negativas”. En cambio, si la muestra arroja señal positiva a estos genes, la misma es sometida a otro tamizaje por PCR-TR pero para la detección de serogrupo. También en este paso, la norma menciona el kit iQ-Check™ STEC SerO II (Bio-Rad Laboratories), aunque puede utilizarse otra PCR-TR teniendo en cuenta los kits validados por USDA mencionados previamente. Si la muestra resulta positiva para alguno de los 7 serogrupos se considera “potencialmente positiva”. Si eso ocurre, a partir de una alícuota del caldo de enriquecimiento se procede al siguiente paso.

- **Aislamiento:** se realiza la SIM y posterior siembra en agar Rainbow modificado. Luego de la incubación, se seleccionan colonias con características fenotípicas del serogrupo buscado y son sometidas a aglutinación en látex para el serogrupo de interés.

- **Confirmación:** las colonias positivas a aglutinación se analizan por PCR-TR para la detección de genes *stx*, *eae* y serogrupo (iQ-Check™ STEC VirX y STEC SerO

Assays). Si alguna colonia resulta positiva a los test, entonces la muestra se considera “positiva presuntiva” y la colonia se siembra en agar tripticasa soya con 5% de sangre de oveja para su posterior confirmación por pruebas bioquímicas. En caso de no identificar colonias características en el agar Rainbow modificado, o que las colonias hayan sido negativas al análisis por PCR-TR, la muestra se informa “negativa”. La confirmación de la cepa se realiza a partir de un cultivo puro de la misma, por medio de pruebas bioquímicas (VITEK 2 Compact), confirmación de antígeno O por test de aglutinación y de genes *stx/eae* (iQ-Check™ STEC VirX). De acuerdo con MLG 5C.03, la muestra se informa positiva a STEC no-O157 si se aisló al menos una cepa positiva para *stx* y *eae*, positiva para alguno de los genes de serogrupos de los seis serogrupos no-O157 que son objeto de la metodología y se identificó bioquímicamente como *E. coli*. En cambio, si las cepas son negativas para *stx*, *eae* o los genes de los seis serogrupos, la muestra es “negativa para STEC no-O157”. En el caso de O157, la muestra se considera positiva si la cepa aislada se identifica bioquímicamente como *E. coli*, se determina serológica y genéticamente como “O157” y cumple al menos uno de los siguientes criterios: Positivo para la producción de toxina Shiga; Positivo para *stx*; o Determinado genéticamente como “H7” (Tabla 26).

## Flujograma USDA MLG 5C.03



## B. *Salmonella* spp.

*Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, Orden *Enterobacteriales*, Clase *Gamma-Proteobacteria*. De acuerdo con la recomendación del Centro Colaborador de la OMS, el sistema actual empleado por el Centro de Enfermedades Infecciosas de USA (CDC), reconoció a *S. enterica* y *S. bongori* como las únicas 2 especies del género *Salmonella*. También describió a *Salmonella enterica* con las subespecies I, II, IIIa, IIIb, IV y VI, y V o *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e indica respectivamente; mientras que *Salmonella bongori* incluye la subespecie V (Oludario et al., 2022).

La especie tipo es *Salmonella enterica*, ya que el 99,8% de las cepas de *Salmonella* aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a *S. enterica* subespecie *enterica* y tienen propiedades bioquímicas características. Las cepas de *Salmonella* fueron agrupadas en más de 2600 serotipos o serovariiedades según sus antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (Vi) (Popa y Papa, 2021).

Entre las serovariiedades de *Salmonella enterica* se incluyen comensales eficaces y patógenos que afectan tanto al hombre como a los animales. Aquellas que causan infecciones en humanos y animales de producción pertenecen a *S. enterica* subespecie *enterica* (Barreto et al., 2016). Cabe mencionar un detalle taxonómico que a menudo causa confusión, las serovariiedades se escriben con mayúscula y sin itálica. Por ejemplo, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serovariedad Enteritidis. Para simplificar se la denomina *S. Enteritidis* y asumimos que nos referimos a una serovariiedad.

Las serovariiedades de *Salmonella* también pueden ser clasificadas según el grado de adaptación a un hospedador específico (Robledo López, 2015):

### - Serovariiedades adaptadas al hombre.

Provocan infecciones en humanos y rara vez afectan a animales (*S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* y *C*, y *S. Sedai*). El principal reservorio es el ser humano y la transmisión es por alimentos y/o agua contaminada por personas enfermas o portadores crónicos asintomáticos.

### - Serovariiedades adaptadas a especies animales.

En este grupo se incluyen serovariiedades específicas de especies como *S. Gallinarum* que solo afecta a las aves, *S. Abortusovis* que afecta a los ovinos y ocasionalmente a los caprinos, y *S. Abortussequi* que afecta a los equinos, entre otros.

### - Serovariiedades no adaptadas a hospedadores específicos.

Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y afectan tanto a los humanos como a los animales. Entre estas serovariiedades podemos mencionar a *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, ya que son los principales agentes etiológicos de las Salmonellosis no-Tifoideas que se registran en el mundo. En este grupo también se puede incluir *S. Dublin*, si bien es específica de bovinos, puede causar infecciones en humanos.

## Salmonellosis

Las serovariiedades de *Salmonella enterica* *Typhi*, *Paratyphi A*, *Paratyphi B* y *Paratyphi C* son agentes etiológicos de Fiebre Tifoidea y Fiebre Paratifoidea, mientras que otras serovariiedades que causan enfermedad en el hombre se denominan Salmonellosis no-Tifoidea.

La Fiebre Tifoidea fue declarada endémica en países tropicales y subtropicales. En todo el mundo, hay una incidencia anual estimada de 16 millones de casos, incluidas 600.000 muertes. Los síntomas que presentan las personas infectadas incluyen fiebre, dolor de cabeza, náuseas, calambres abdominales, vómitos y diarrea. En casos graves o crónicos, se pueden ex-

perimentar otros síntomas como la artritis entre 3 y 4 semanas después del inicio de los síntomas (Oludairo *et al.*, 2022).

La manifestación clínica de la Fiebre no-Tifoidea es la inflamación intestinal aguda, que puede afectar al intestino delgado y/o al intestino grueso (enteritis o enterocolitis). La transmisión de *Salmonella* al ser humano se produce por consumo de alimentos de origen animal, especialmente huevos, pollo, carne y productos lácteos, productos frescos contaminados por desechos animales y/o humanos, contacto con animales o su medio ambiente y agua contaminada (Quiróz Cárdenas, 2016). *Salmonella Enteritidis* es una de las causas más comunes de gastroenteritis por infección de origen alimentario en humanos, considerada por algunos autores como la más importante en todo el mundo (Kirk *et al.*, 2015) y la tercera causa de muerte humana entre las enfermedades diarreicas en todo el mundo (Ferrari *et al.*, 2019).

### ***Salmonella* spp. en la cadena de producción de la carne bovina de Argentina**

En Argentina se realizaron estudios que destacan la presencia de distintas serovariedades de *Salmonella* en matrices cárnicas y subproductos. En frigoríficos provinciales de Buenos Aires que no aplican APPCC, se aisló *S. Anatum*, *S. Give*, *S. Typhimurium*, *S. Cerro* y *S. Montevideo* a partir de muestras de medias reses. Además, fue posible el aislamiento de *S. Typhimurium* en una muestra de carne de cabeza y *S. Anatum* y *S. Montevideo* a partir de muestras del agua de lavado y enfriado de chinchulines, riñones, mollejas e hígado (Costa *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2022). Por su parte en frigoríficos provinciales de Tucumán (sin APPCC), se aisló *Salmonella* a partir del 7,5% de las medias reses analizadas y entre las serovariedades se identificó *S. Cerro*, *S. Corvallis* y *S. Agona* (Perez Terrazzino *et al.*, 2022). No solo los frigoríficos fueron

entornos en los que se detectó la presencia de *Salmonella* en productos cárnicos, sino también en las carnicerías del municipio de Berisso, donde el 10,4% de las muestras de carne picada analizadas, fueron positivas. En dicho estudio se aisló *S. Newport*, *S. Saintpaul*, *S. Meleagridis*, *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Derby*, *S. Panama*, *S. Give*, *S. Oranienburg* y *S. Montevideo* (Leotta *et al.*, 2016).

### **Detección y aislamiento de *Salmonella* en alimentos**

Las metodologías actuales de procesamiento de alimentos para el análisis de *Salmonella* aplican enriquecimientos en serie con una selectividad creciente que culmina en el aislamiento de *Salmonella* en placas de agar diferencial selectivo.

En laboratorios de plantas frigorífica se utilizan métodos rápidos como tamizajes a partir del caldo de pre-enriquecimiento, los cuales pueden ser utilizados entre 18 y 24 h según las recomendaciones del fabricante del método rápido. La confirmación de colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas, técnicas moleculares y métodos rápidos puede realizarse en laboratorios externos debidamente acreditados para tal fin. En Argentina, la identificación de serovariedades y la subtipificación de los aislamientos (resistencia antibacteriana, secuenciación, etc.) se realiza en el Laboratorio Nacional de Referencia (ANLIS-Malbrán).

Las muestras de productos, subproductos cárnicos y ambiente pueden ser analizadas de acuerdo con alguna de las metodologías descriptas a continuación según las exigencias del país de destino (Tabla 31).

**Tabla 31.** Criterios microbiológicos que incluyen *Salmonella* en productos cárnicos bovinos comparados según destino.

DESTINO	MATRIZ	PLAN DE MUESTREO		LÍMITE	NORMA	METODOLOGÍA EN SU VERSIÓN MÁS ACTUAL
		N	C			
Argentina <sup>1</sup>	Carne picada fresca	5	0	Ausencia en 25 g	Art 255 CAA	ISO 6579 USDA-FSIS MLG 4.14
	Salazones cocidas y crudas	5	0	Ausencia en 25 g	Art 286 bis y 286 tris CAA	ISO 6579 BAM-FDA USDA-FSIS
	Pernil	5	0	Ausencia en 25 g	Art 293 bis CAA	ISO 6579 BAM-FDA
	Chacinados embutidos frescos, secos, cocidos.	5	0	Ausencia en 25 g Ausencia en 10 g (frescos)	Art 302 CAA	ISO 6579 BAM-FDA USDA-FSIS
	Chacinados no embutidos frescos y cocidos	5	0	Ausencia en 25 g Ausencia en 10 g (frescos)		
Brasil	Productos con agregado de inhibidores	5	0	Ausencia en 25 g	INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 161, DE 1º DE JULHO DE 2022	<a href="https://www.gov.br/agricultura-pt-br/assuntos/ifa/legislação-metodos-da-rede-ifda/po/me/todos_oficiais_para_analise_de_produtos_de_origem_animal_1a_ed-2022_assinado.pdf">https://www.gov.br/agricultura-pt-br/assuntos/ifa/legislação-metodos-da-rede-ifda/po/me/todos_oficiais_para_analise_de_produtos_de_origem_animal_1a_ed-2022_assinado.pdf</a>
	Productos naturales (carne bovina congelada, refrigerada, con hueso, sin hueso, menudencias)					
	Productos cárnicos bovinos sometidos a tratamiento térmico/cocción					
Chile	Carne cruda	5	1	Ausencia en 25 g	Reglamento Sanitario de los Alimentos	
	Cecinas cocidas y crudas (hamburguesas). Cecinas crudas maduradas y acidificadas	5	0	Ausencia en 25 g		
China	Carne bovina	5	0	Ausencia en 25 g	GB-T 17238	GB/T 4789.4
Israel	Carne bovina	5	0	Ausencia en 25 g		EN/ISO 6579 MLG 4.14
Unión Europea	Canales bovinas, ovinas, caprinas y equinas	50 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	Ausencia en la zona examinada por canal	Reglamento 2073/2005	EN/ISO 6579
	Carne picada y preparados de carne destinados a ser consumidos crudos	5	0	Ausencia en 25 g		
	Carne separada mecánicamente <sup>5</sup>	5	0	Ausencia en 10 g		
	Productos cárnicos destinados a ser consumidos crudos, excluidos los productos en los que el proceso de fabricación o la composición del producto elimine el riesgo de <i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g		
USA	Carcasas y esponjas ambientales	1	0	Ausencia en 1 esponja		MLG 4.14
	Cortes y recortes importados para elaboración de productos cárnicos	60 <sup>5</sup>	0	Ausencia en 325 g ± 32,5 g (FSIS Directive 10010.1 Rev 5)	MT51	MLG 4.14
	Carne picada importada		0	Ausencia en 325 g ± 32,5 g (FSIS Directive 10010.1 Rev 5)	MT08	MLG4.14
Rusia	Carne bovina refrigerada y congelada. Menudencias	5	0	Ausencia en 25 g	SanPin 2.3.2. 1078-01	EN/ISO 6579

1- Se recomienda complementar la información con el anexo 2 (capítulo V de este manual), en la que se comparan las Circulares Senasa.

2- Se aplica en medianas reses antes del enfriamiento. Acciones correctivas. Mejoras en la higiene del sacrificio, revisión de los controles del proceso y del origen de los animales.

3- Las 50 muestras proceden de diez sesiones consecutivas de muestreo, conforme a las normas y frecuencias de muestreo establecidas en el Reglamento 2073.

4- El número de muestras cuando se detecta la presencia de *Salmonella*. El valor C está sujeto a revisión con el fin de tener en cuenta los progresos obtenidos en la reducción de la prevalencia de *Salmonella*. Los Estados miembros o las regiones que tengan baja prevalencia de *Salmonella* podrán usar valores C inferiores incluso antes de la revisión.

5- Anexo III, sección V, capítulo III, apartado 3, del Reglamento (CE) no 853/2004.

6- En lotes con independencia microbiológica.

## ISO 6579-1

Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección, enumeración y serotipificación de *Salmonella*. Parte 1: Detección de *Salmonella* spp. Esta metodología fue validada para muestras de alimentos de consumo humano y animal, heces de animales y muestras ambientales de la etapa de producción primaria.

- **Pre-enriquecimiento:** en un caldo no selectivo como agua peptonada bufferada (APB o BPW). Temperatura y tiempo de incubación: 34-38°C durante 18±2 h.
- **Enriquecimiento selectivo:** se realiza con dos medios líquidos y diferentes condiciones de cultivo.

- 1) caldo Rappaport-Vassiliadis soja (RVS) a 41,5±1°C durante 24±3 h.
- 2) caldo tetratiónato de Muller Kauffmann con novobiocina (MKTn) a 37±1°C durante 24±3 h.

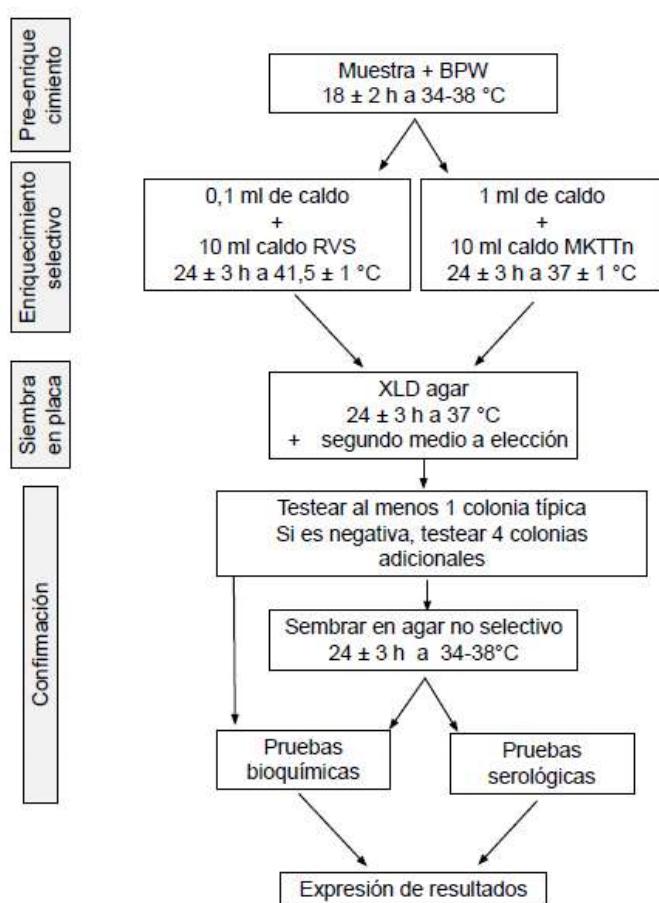
- **Aislamiento:** de cada uno de estos caldos se realiza la siembra por estría:

- 1) agar selectivo xirosa lisina desoxicílato (XLD)
- 2) un segundo medio selectivo a elección

Temperatura y tiempo de incubación: 37°C durante 24±3 h.

- **Confirmación:** ante la identificación de al menos una colonia típica es necesario repicarla en un agar no selectivo y realizar pruebas bioquímicas y serológicas, previo a informar el resultado final.

## Flujograma ISO 6579-1



## USDA MLG 4.14

Aislamiento e identificación de *Salmonella* en carnes, aves, huevos pasteurizados, medias reses y esponjas ambientales de áreas de producción y manipulación de alimentos.

- **Pre-enriquecimiento:** para los productos cárnicos se utiliza caldo tripticasa de soja modificado (CTSm). Temperatura y tiempo de incubación: 42±1 °C durante 15-24 h.

- **Tamizaje molecular:** método rápido 3M™ Molecular Detection System o equivalente, que permite finalizar el análisis ante un resultado negativo. Las muestras con resultado positivo en el tamizaje deben continuar con el enriquecimiento. Las muestras con resultado no concluyente deben ser repetidas desde el paso de lisado o preparar nuevos tubos de lisado y repetir el análisis. De ser necesario proseguir con la marcha convencional.

- **Enriquecimiento selectivo:** se realiza con dos medios líquidos y diferentes condiciones de cultivo.

1) inocular  $0,1 \pm 0,02$  ml del caldo de pre-enriquecimiento en 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis Soja Peptona (RVS). Temperatura y tiempo de incubación:  $42 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 22-24 h.

2) inocular  $0,5 \pm 0,05$  ml del caldo de pre-enriquecimiento en caldo tetracionato (Hajna) (TT). Temperatura y tiempo de incubación:  $42 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  durante 22-24 h.

- **Aislamiento:** de cada uno de estos caldos se realiza la siembra por estría:

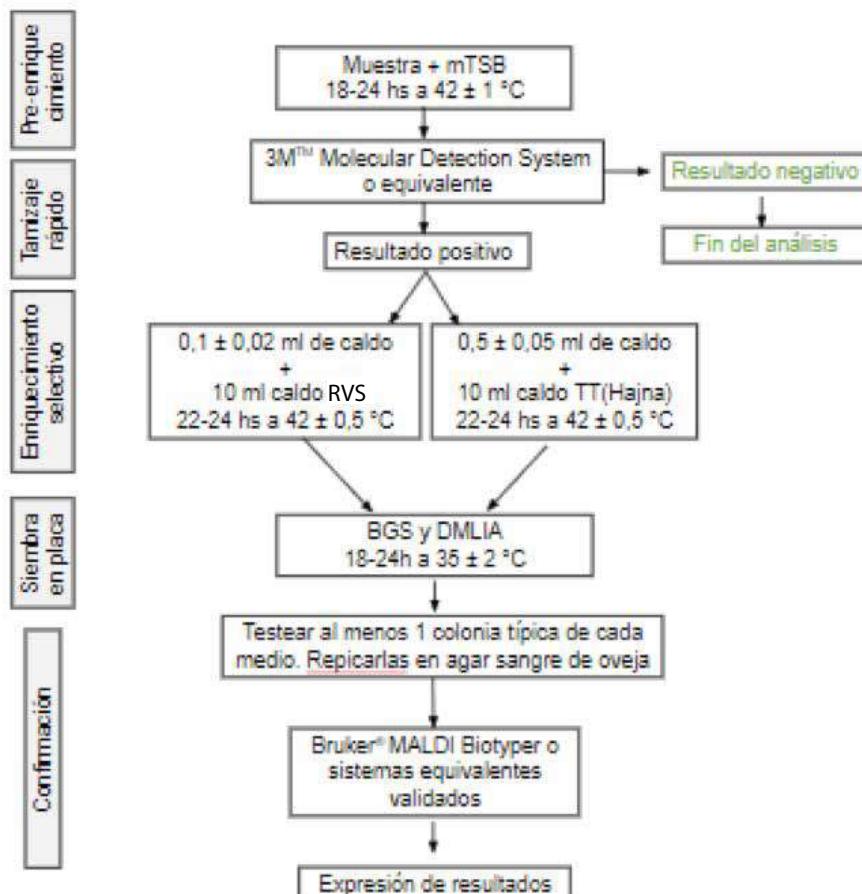
- 1) agar verde brillante sulfa (BGS)
- 2) agar lisina hierro doblemente modificado (DMLIA)

Temperatura y tiempo de incubación:

$35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 18-24 h. En caso de no obtener colonias durante las primeras 24 h de incubación, las placas permanecerán en la estufa de cultivo durante 18-24 h adicionales”

- **Confirmación:** las colonias típicas se confirmarán de al menos una de cada placa. Para ello, es necesario sembrar las colonias aisladas en agar tripticasa de soja con el agregado de 5% de sangre de oveja. Realizar pruebas de confirmación utilizando una única colonia aislada. Se deben emplear sistemas de prueba disponibles comercialmente como Bruker® MALDI Biotyper o sistemas equivalentes validados. El aislamiento de *Salmonella* se caracterizará también por la prueba de susceptibilidad antimicrobiana (sistema comercial AST) y secuenciación del genoma completo (WGS).

### FlujoGRAMA MLG 4.14



## C. *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* es la especie de mayor interés del género *Listeria*, ya que es el principal agente etiológico de listeriosis en el ser humano, y *L. ivanovii* por ser patógena en ovinos y caprinos, afectando ocasionalmente al ser humano (Gan *et al.*, 2020). *L. seeligeri* y *L. welshimeri* causan infección en humanos con baja frecuencia. Por el momento, las otras especies de *Listeria* no fueron asociadas con enfermedades del hombre y los animales (Shivendra *et al.*, 2020).

La serotipificación de esta bacteria se basa principalmente en la variación de los antígenos somático (O) y flagelar (H), lo que permite identificar 14 serotipos diferentes (Feng *et al.*, 2020). Al menos el 95% de los aislamientos de alimentos contaminados y casos clínicos son de los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b. Los serotipos 4b, 1/2b y 1/2c se describen como patógenos, siendo el 4b responsable de la mayoría de los casos de listeriosis humana; mientras que el 1/2a es el más frecuente en los alimentos (Alía *et al.*, 2020).

*Listeria monocytogenes* es un patógeno oportunista que presenta la particularidad de resistir a diversas condiciones de estrés como congelación, secado, acidez y frío, pudiéndose adaptar a estas condiciones mediante la producción de biofilms. Esta característica representa un grave problema para la industria alimentaria por la dificultad en el control de las plantas de procesado (Figueroa, 2022).

## Listeriosis

La enfermedad clínica asociada con las infecciones por *L. monocytogenes* varía desde gastroenteritis autolimitada con fiebre hasta infecciones invasivas que conducen a la hospitalización y posiblemente a la muerte. Esta enfermedad presenta una alta mortalidad. Las infecciones invasivas graves ocurren principalmente en personas

con afecciones que comprometen el funcionamiento normal del sistema inmunitario. Estos incluyen mujeres embarazadas y recién nacidos, personas mayores y personas con otras condiciones inmunocomprometidas (Farber *et al.*, 2021).

Debido a que los alimentos son la principal ruta de entrada del patógeno, el tracto gastrointestinal es el primer sitio de contacto de *L. monocytogenes* en el hospedero. Esta bacteria es capaz de atravesar las tres barreras fisiológicas: intestinal, hematoencefálica y placentaria. Al cruzar la barrera intestinal, la bacteria se absorbe desde el lumen intestinal atravesando las células epiteliales y si el sistema inmune no logra controlar la infección, la bacteria continúa multiplicándose y la infección puede diseminarse al torrente sanguíneo (Lopes-Luz *et al.*, 2021).

## *Listeria spp.* en alimentos

En nuestro país, la búsqueda de *Listeria monocytogenes* en carne cruda no es obligatoria, motivo por el cual no se cuenta con gran cantidad de datos. De acuerdo con Figueroa (2022), sobre 585 muestras de carne bovina cruda analizadas entre 2016 y 2021, se obtuvieron 82 (14%) muestras positivas a *L. monocytogenes*. Durante un estudio realizado en carnicerías del municipio de Berisso (Leotta *et al.*, 2016), se demostró que el 46,5% de las muestras de carne picada estaban contaminadas con *L. monocytogenes*. Luego de la implementación de mejoras, como BPH, BPM y POES, la cantidad de muestras de carne picada positivas se redujo al 15,1%.

Entre los alimentos que poseen un criterio para *L. monocytogenes* en el Código Alimentario Argentino (CAA), se encuentran salazones y chacinados, para los cuales exige ausencia en 25 g de muestra. En una evaluación cuantitativa de riesgo de listeriosis por consumo de este tipo de productos se estimó que, en Argentina el ries-

go de listeriosis por consumo de embutidos fermentados en poblaciones de riesgo es bajo y por salazones es insignificante (incluso en la subpoblación más susceptible). El modelo incluyó las variables y características de la cadena de producción de estos alimentos en Argentina. Se incluyeron datos sobre la prevalencia inicial y el nivel de contaminación de *L. monocytogenes*, elaboración con o sin un cultivo iniciador, tiempo y la temperatura durante la distribución y el almacenamiento antes del consumo y los hábitos de consumo en Argentina. El principal factor protector asociado a la probabilidad de listeriosis por consumo de embutidos fermentados fue el uso de cultivos iniciadores durante su elaboración. De acuerdo con el análisis de sensibilidad, la utilización de iniciadores durante la elaboración de chacinados embutidos fermentados reduce el riesgo de listeriosis en al menos tres órdenes de magnitud. En el caso de las salazones, tanto el nivel de actividad de agua como el estricto control de la temperatura del proceso fueron los principales factores de riesgo para adquirir listeriosis por este tipo de alimentos. De este estudio se desprende, que el nivel de protección que otorga el criterio microbiológico argentino vigente para embutidos fermentados y salazones garantizaría la inocuidad de estos productos de manera similar al criterio utilizado en otros países (<100 UFC/g) (Brusa *et al.*, 2021).

## Detección y aislamiento de *Listeria monocytogenes* en alimentos

Las metodologías actuales de procesamiento de alimentos para el análisis de *Listeria* incluyen la utilización de enriquecimientos selectivos debido a que la carga de *L. monocytogenes* suele ser baja y con frecuencia la flora acompañante impide su desarrollo. Además, los medios selectivos permiten la recuperación de *L. monocytogenes* estresadas.

En la industria alimentaria se utilizan métodos rápidos para reducir el tiempo analítico para la liberación de los productos al mercado. En este contexto, se requieren tamizajes altamente sensibles, si es posible sin falsos resultados negativos, ya que las técnicas microbiológicas convencionales demoran entre 5 a 7 días para la detección e identificación del género *Listeria* y especie *L. monocytogenes*.

En laboratorios de plantas frigoríficas se recomienda realizar el enriquecimiento y utilizar métodos rápidos de tamizaje. En caso de obtener resultados positivos decidir sobre el lote de producto o enviar las muestras a confirmar a un laboratorio externo. Según el destino de los productos se deberá garantizar el cumplimiento específico de los criterios microbiológicos (Tabla 32).

**Tabla 32.** Criterios microbiológicos que incluyen *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos bovinos comparados según destino.

DESTINO	MATRIZ	PLAN DE MUESTREO			LÍMITES	NORMA	METODOLOGÍA EN SU VERSIÓN MÁS ACTUAL*
		N	C	m			
Argentina <sup>1</sup>	Salazones cocidas y crudas	5	0		Ausencia en 25 g	Art 286 bis y 286 tris CAA	ISO 11290-1 BAM-FDA USDA-FSIS
	Pernil	5	0		Ausencia en 25 g	Art 293 bis CAA	ISO 11290-1 BAM FDA USDA-FSIS
	Chacinados embutidos secos y cocidos	5	0		Ausencia en 25 g	Art 302 CAA	ISO 11290-1 BAM-FDA USDA-FSIS
	Chacinados no embutidos cocidos	5	0		Ausencia en 25 g		
Brasil	Alimentos listos para el consumo	5	0	10 <sup>2</sup>	Ausencia en 25 g	Instrução Normativa IN N° 161, de 1 de junio de 2022	M20 <sup>5</sup>
Chile	Alimentos listos para el consumo <sup>2</sup>	5	0		Ausencia en 25 g	Art 174 Reglamento Sanitario de los Alimentos	
	Alimentos listos para el consumo que NO favorecen el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> <sup>3</sup>	5	0	10 <sup>2</sup>	Hasta 100 ufc/g		
Rusia	Carne cruda refrigerada y congelada	5	0		Ausencia en 25 g	SanPin 2.3.2 1078-01	ISO 11290-1
Unión Europea	Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales <sup>4</sup>	5	0	10 <sup>2</sup>	100 ufc/g	Reglamento 2073/2005	EN/ISO 11290-2
	Alimentos listos para el consumo antes de que hayan abandonado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria cuando éste no pueda demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil	5	0		Ausencia en 25 g		EN/ISO 11290-1
USA	Alimentos cárnicos listos para el consumo	5	0		Ausencia en 25 g		MLG 8.13

\* Utilizar la última versión disponible.

1- Se recomienda complementar la información con el anexo 2 (capítulo V de este manual), en la que se comparan las Circulares Senasa.

2- Excepcionalmente, para alimentos que favorecen el desarrollo de *Listeria monocytogenes*, se aplicará el criterio de aquellos alimentos que no favorecen su desarrollo, cuando el fabricante o el productor, sea capaz de garantizar y demostrar, a través de la aplicación de tecnologías, que el producto no superará el límite de 100 UFC/g durante su vida útil. Esta situación deberá ser demostrada, en su caso, ante la autoridad sanitaria.

3- En los alimentos listos para el consumo se considera que no favorecen el desarrollo de *Listeria monocytogenes* cuando cumplen alguno de los siguientes parámetros:

- pH menor o igual a 4,4;
- actividad de agua ( $a_w$ ) menor o igual a 0,92;
- combinación de pH y  $a_w$ , con pH menor o igual de 5,0 y con  $a_w$ , menor o igual a 0,94;
- congelación, siempre que esta condición se mantenga durante todo el período, hasta antes de ser consumido;
- vida útil en refrigeración por un lapso de menos de 5 días.

4- Se considera automáticamente que pertenecen a esta categoría los productos con:

- pH ≤ 4,4 o  $a_w \leq 0,92$ .
- pH ≤ 5,0 y  $a_w \leq 0,94$ .
- vida útil inferior a 5 días.
- otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente.

5- [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfd/legislacao-metodos-da-rede-lfd/poa/metodos\\_oficiais\\_para\\_analise\\_de\\_produtos\\_de\\_origem\\_animal-\\_1a\\_ed\\_-2022\\_assinado.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfd/legislacao-metodos-da-rede-lfd/poa/metodos_oficiais_para_analise_de_produtos_de_origem_animal-_1a_ed_-2022_assinado.pdf)

Para el análisis microbiológico tradicional de productos cárnicos para la detección y aislamiento de *Listeria* se dispone de 2 metodologías validadas: ISO 11290 y MLG 8.13.

## ISO 11290-1

Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria* spp. La metodología es aplicable al análisis de alimentos humanos y animales y muestras ambientales de las áreas de producción y manipulación de alimentos.

- **Primer enriquecimiento:** en caldo Half Fraser (HF). Temperatura y tiempo de incubación:  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24-26 h.

- **Segundo enriquecimiento:** 0,1 ml del primer enriquecimiento en 10 ml de caldo Fraser (CF). Temperatura y tiempo de incubación:  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24±2 h.

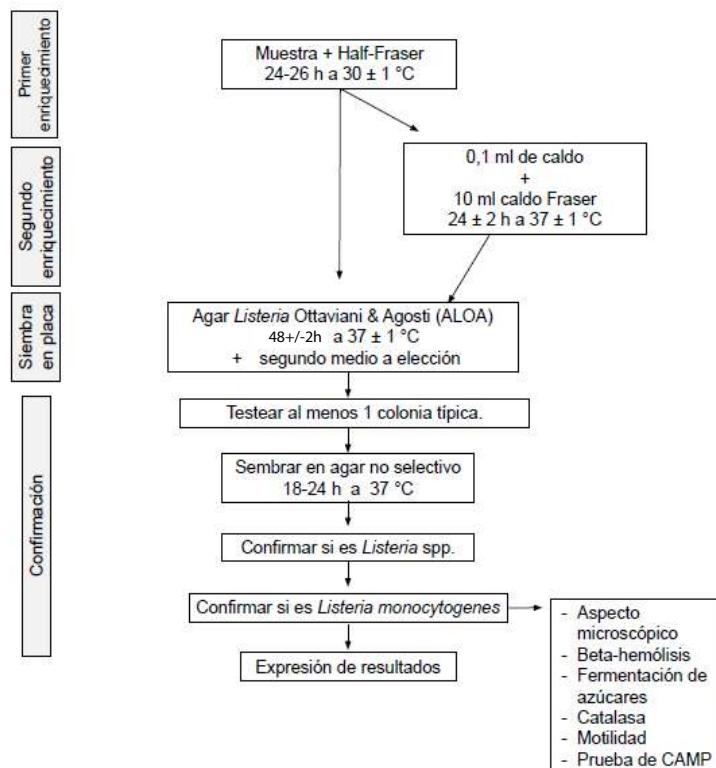
### Aislamiento:

1) a partir del primer enriquecimiento (24 h de incubación) se siembra en agar *Listeria* Ottaviani & Agosti (ALOA) y un segundo medio a elección para la búsqueda de colonias típicas. Temperatura y tiempo de incubación:  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24±2 h, dependiendo del crecimiento de las colonias.

2) a partir del segundo enriquecimiento (24 h de incubación, en total 48 h desde que comenzó el análisis) se siembra en ALOA y un segundo medio a elección para la búsqueda de colonias típicas. Temperatura y tiempo de incubación:  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24-48 h, dependiendo del crecimiento de las colonias.

**Confirmación:** las colonias típicas, se replicarán a un agar no selectivo y en primera instancia será necesario identificar si son colonias de *Listeria* spp. y luego si son *L. monocytogenes* mediante pruebas como aspecto microscópico, beta-hemólisis, prueba de CAMP, fermentación de azúcares, catalasa y motilidad.

## Flujograma ISO 11290-1



## USDA MLG 8.13

Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* a partir de carnes rojas, aves, siluriformes (pescado), listos para consumo, productos de huevo, y muestras ambientales.

- **Primer enriquecimiento:** en caldo de la Universidad de Vermont modificado (UVM). Temperatura y tiempo de incubación:  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 20-26 h.

- **Siembra en medio sólido:** a partir del primer enriquecimiento y luego de 24 h de incubación, sembrar en agar Oxford modificado (MOX). Temperatura y tiempo de incubación:  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 26±2 h.

- **Segundo enriquecimiento:** sembrar  $0,1 \pm 0,02$  ml del primer enriquecimiento en  $10 \pm 0,5$  ml de caldo *Listeria* tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS-BLEB). Temperatura y tiempo de incubación:  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 18-24 h.

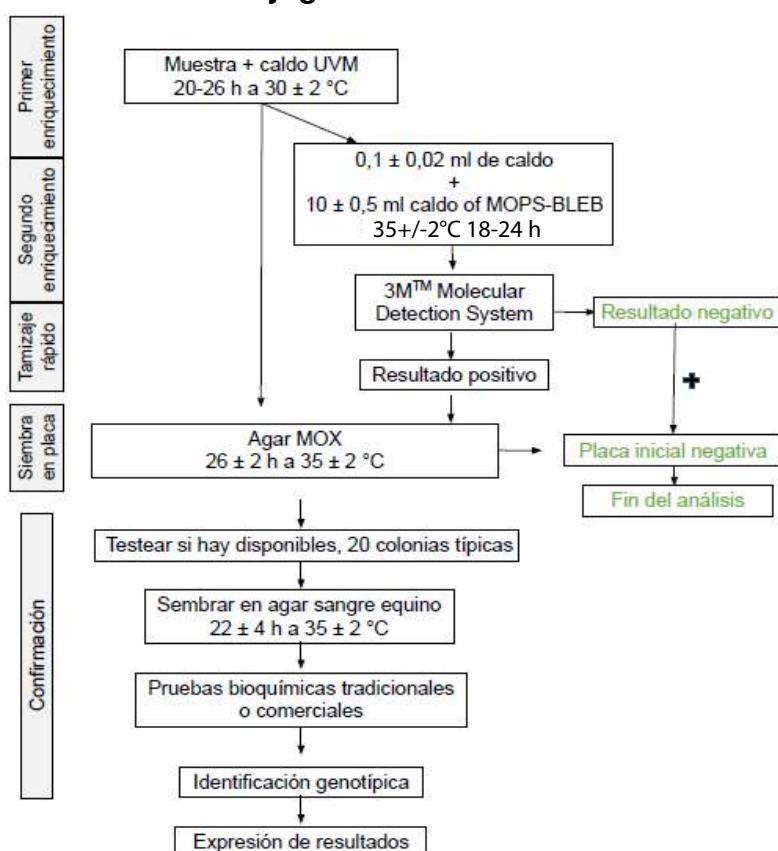
- **Tamizaje molecular:** a partir del segundo enriquecimiento utiliza el método rápido 3M™ Molecular Detection System (MDS) o equivalente. Ante un resultado negativo del método rápido y el no crecimiento de colo-

nias típicas en la placa de MOX (aislamiento 1), puede detenerse la marcha e informarse como muestra negativa. En cambio, ante la presencia de un resultado positivo o el crecimiento de colonias típicas en la placa de MOX es necesario continuar con la confirmación. Por otro lado, si se obtuvo un resultado positivo a partir del tamizaje del segundo enriquecimiento, se sembrará también una ansada a partir de este caldo en las placas de agar selectivo.

- **Aislamiento:** a partir del segundo enriquecimiento se siembra en MOX. Temperatura y tiempo de incubación:  $35\pm 2^\circ\text{C}$  durante  $26\pm 2$  h.

- **Confirmación:** verificar la presencia de 20 colonias típicas. Sembrar en agar sangre equino y luego de un período de incubación a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  durante  $22\pm 4$  h realizar pruebas bioquímicas e identificación genotípica.

### Flujograma MLG 8.13



## D. TÉCNICAS DE SCREENING O TAMI- ZAJE PARA LA DETECCIÓN DE BACTE- RIAS PATÓGENAS EN ALIMENTOS

Los métodos tradicionales no permiten tomar decisiones rápidas, causando incrementos en el costo del producto final, antes de su liberación. De allí, que se busque la aplicación de métodos rápidos y sensibles, que permitan detectar el patógeno en muestras de alimentos, de una manera eficaz y rápida; lo que accedería a llevar un control más eficiente del proceso de producción y tomar decisiones a corto plazo (Ramírez Mérida *et al.*, 2010).

Al momento de elegir un kit, es fundamental conocer para qué matrices alimentarias o no alimentarias (ambiente) fue validado y con qué caldos de enriquecimiento y equipos se realizó esa validación. Por ejemplo, en algunos casos es necesario utilizar un caldo de enriquecimiento específico provisto con el kit. La información respecto a las validaciones que tiene cada

kit se puede encontrar en el manual de uso o solicitarse al proveedor del producto. Independientemente del tipo de kit utilizado, es fundamental seguir siempre las instrucciones del fabricante tal como describe el manual de uso, ya que de esa forma se podrá asegurar el resultado.

### 1. Técnicas inmunológicas de tamizaje

Los métodos inmunológicos para detectar patógenos o sus toxinas son pruebas analíticas que utilizan anticuerpos para detectar estos antígenos. Todas las técnicas inmunológicas rápidas tienen en común que requieren, al menos, un anticuerpo (antisuero o inmunosuero) para detectar un antígeno específico del microorganismo buscado.

En la Tabla 33 se presentan los kits inmunológicos disponibles en el mercado para tamizaje de STEC, *Salmonella* y *Listeria*.

Tabla 33. Kits de tamizaje inmunológicos disponibles en Argentina para STEC, *Salmonella* spp. y *Listeria* spp. validados para carne bovina cruda\*.

NOMBRE	PRINCIPIO	PATÓGENO	KIT	VALIDACIÓN	Nº	CALDO <sup>1</sup>	INCUBACIÓN	TIEMPO DE KIT	PROVEEDOR	
VIP® Gold	Inmunoensayo	EHEC	VIP® Gold EHEC	AOAC Carne cruda	1	CTS <sub>m+n</sub>	37-37°C, 18-28 h	15-20 min	Merck atencion_industria@merckgroup.com	
1-2 Test® <i>Salmonella</i>	Inmunoensayo	<i>Salmonella</i>	1-2 Test® <i>Salmonella</i>	AOAC Carne cruda	1	Caldo lactosa	35-37°C, 24±2 h	14-30 h	Merck atencion_industria@merckgroup.com	
						Caldo tetrionato verde brillante activado con iodo-ioduro	42±0,5°C en baño María 6-8 h			
Singlepath®	Inmuncromatografía	<i>E. coli</i> O157	Singlepath® <i>E.coli</i> O157	AOAC Carne picada cruda	1	mEC+n	35-37°C, 18-24 h	20 min	Merck atencion_industria@merckgroup.com	
		<i>Salmonella</i>	Singlepath® <i>Salmonella</i>	AOAC Carne picada cruda	1	APB	37°C, 18±2 h	20 min		
						RVS	41,5°C, 24±3 h			
VIDAS® UP	ELFA	<i>E. coli</i> O157:H7	VIDAS® UP ECPT	AOAC Carne picada	30	APB (precalentado a 41,5±1 °C) APB (precalentado a 41,5 ±1°C) + Suplemento Vancomicina. Para muestras de 75 g o 375 g	41,5±1°C, 7-24 h (Muestras de 375 g incubar 10-24 h)	50 min	bioMérieux consultas.ar@biomerieux.com	
		<i>Salmonella</i>	VIDAS® UP <i>Salmonella</i> (SPT)	AOAC Carne cruda	30	APB + <i>Salmonella</i> suplemento APB + <i>Salmonella</i> suplemento (precalentado a 42±1°C) muestras 375 g	42±1°C, 18-24 h 42±1°C, 22-26 h (muestras 375 g)	48 min		
		<i>Listeria</i>	VIDAS® UP <i>Listeria</i> spp	AOAC Carne picada cruda	30	<i>Listeria</i> Phage Technology (LPT)	30±1°C, 26-30 h	62 min		
		<i>Listeria monocytogenes</i>	VIDAS® LMO2	AOAC Carne cruda	30	Half Fraser Fraser	30±1°C, 24-26 h 30±1°C, 24-26 h	70 min		
Reveal® 2.0	Inmuncromatografía	<i>E. coli</i> O157:H7	Reveal® 2.0 <i>E.coli</i> O157:H7	AOAC Carne picada cruda	1	Caldo Reveal de 8 h	42±1°C, 8 h	15 min	Neogen: pedidosARG@-neogen.com	
			Reveal® 2.0 <i>E.coli</i> O157:H7	AOAC Carne picada cruda	1	Caldo Reveal de 20 h	36±1°C, 20 h	15 min		
		<i>Salmonella</i>	Reveal® 2.0 <i>Salmonella</i>	AOAC Carne picada cruda	1	Caldo RV	42±1°C, 20-24 h	15 min		
RapidChek®	Inmuncromatografía	<i>E. coli</i> O157	RapidChek® <i>E. coli</i> O157	AOAC Carne picada cruda	1	Caldo del kit	42°C, 8 h	10 min	Medica-tec S.R.L. ventas@medica-tec.-com.ar Hixwer Argentina S.A. info@hixwer.com	
		<i>Salmonella</i>	RapidChek® SELECT™ <i>Salmonella</i>	AOAC Carne picada cruda	1	Caldo del kit primario	42°C, 16-22 h	10 min		
						Caldo del kit secundario	42°C, 16-22 h			

\* Previo al uso de un kit presente en esta tabla, con otra matriz, verificar su validación correspondiente en el certificado de validación correspondiente.

Nº: cantidad de muestras analizadas en simultáneo. APB: Agua buferada peptonada. RV: Caldo Rappaport Vassiliadis.

<sup>1</sup> Caldo de enriquecimiento.

## 1.1. Inmunocromatografía

La inmunocromatografía, es una técnica de inmunodiagnóstico que permite detectar patógenos sin requerir equipamiento, en 5 a 20 min según el dispositivo utilizado, a partir de una alícuota del caldo de enriquecimiento luego de un período de incubación que puede variar entre 24 y 48 h según las instrucciones del fabricante. Su resultado es fácil de interpretar e incluye una línea de control cuya aparición confirma el correcto funcionamiento del ensayo.

Entre las limitaciones que poseen estos dispositivos se incluye que la exactitud y la sensibilidad en ocasiones son insatisfactorias (Mitamura *et al.*, 2013). Los dispositivos inmunocromatográficos para detección de bacterias patógenas permiten analizar una sola muestra.

Estos dispositivos presentan una región de siembra y una región inmunocromatográfica, con una zona de ensayo y una zona control donde se producirá la reacción antígeno-anticuerpo. En el mercado se ofrecen diferentes formatos de ensayos de inmunocromatografía. Estos dispositivos siempre son utilizados luego de un período de pre-enriquecimiento o enriquecimiento de 18-24 h.

La muestra se coloca en la zona de siembra y migra a través de una membrana de nitrocelulosa. En los ensayos tipo sándwich, en la primera porción se encuentra con una zona que contiene anticuerpos específicos conjugados con partículas de oro coloidal. En caso de estar presente en la muestra el antígeno (patógeno), se forma un complejo antígeno-anticuerpo (marcado con oro coloidal) que migra desde la región de siembra hasta la zona de ensayo. En la zona de ensayo se encuentra fijo un segundo anticuerpo contra el patógeno que estamos buscando. Este anticuerpo captura al complejo inmune conjugado con partículas de oro coloidal y revela una línea transver-

sal visible de color rojo, azul, etc. El remanente de la muestra continúa migrando a través de la membrana de nitrocelulosa hasta la zona control, donde se encuentran anticuerpos anti-especie, que capturan y agregan los anticuerpos marcados con oro coloidal para formar una línea visible. En el caso de muestras negativas solo aparecerá coloreada la zona control, mientras que si la muestra es positiva aparecerán coloreadas tanto la zona de control como la de reacción. El ensayo no se considera válido si esta línea no aparece.

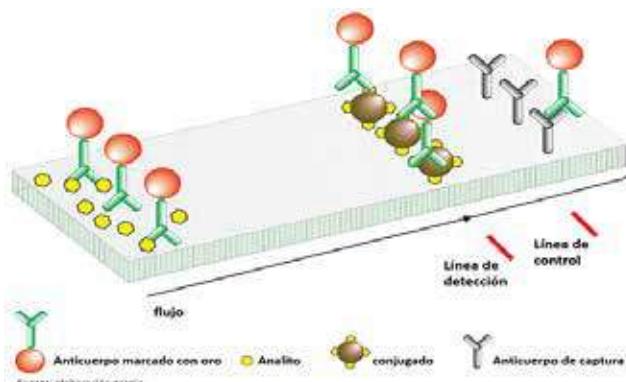


Figura 37. Esquema simplificado de una tira inmunocromatográfica (Mercader *et al.*, 2020)

## 1.2. ELISA-ELFA

La técnica inmunoenzimática de ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, por sus siglas en inglés) se caracteriza por el empleo de marcadores enzimáticos para la detección y amplificación de las reacciones antígeno-anticuerpo.

En la identificación de microorganismos y/o sus toxinas o metabolitos, un anticuerpo se fija a un soporte sólido, que permiten su adsorción pasiva y la eliminación de los compuestos libres mediante lavado. Una vez inmovilizados, se agrega una muestra. Si hay antígenos presentes en la muestra, se unirán al anticuerpo en la placa. A continuación, se añade a la placa un segundo anticuerpo que reconoce los antígenos unidos. Este anticuerpo está vinculado a una enzima, que producirá una reacción detectable (cambio de color) si se

une a una molécula de antígeno y fijada a la placa.

Actualmente, en Argentina no se comercializan kits de ELISA validados para matrices cárnicas. Sin embargo, existen sistemas automatizados de inmunodetección rápida de patógenos basado en la técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

La metodología ELFA se basa en los principios del ELISA “sándwich”. Presenta alta sensibilidad y especificidad para la detección de antígenos, con una lectura final de fluorescencia, la cual es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Permite obtener resultados de fácil interpretación (positivo o negativo) en 50 a 60 min luego de un enriquecimiento de 18-24 h. Se destacan como ventajas la posibilidad de analizar varias muestras simultáneamente. Con el mismo equipo se puede realizar inmunoconcentración automatizada.

Se debe considerar que esta metodología es equipo dependiente y se requiere entrenamiento para el uso de los mismos.

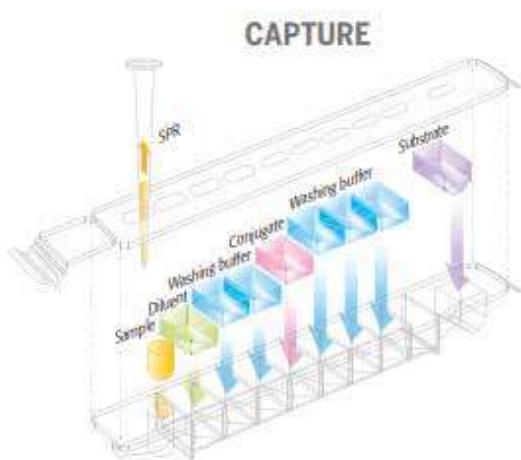


Figura 38 a. Esquema representativo de los pasos automatizados en la técnica ELFA (VIDAS®, bioMérieux S.A.)

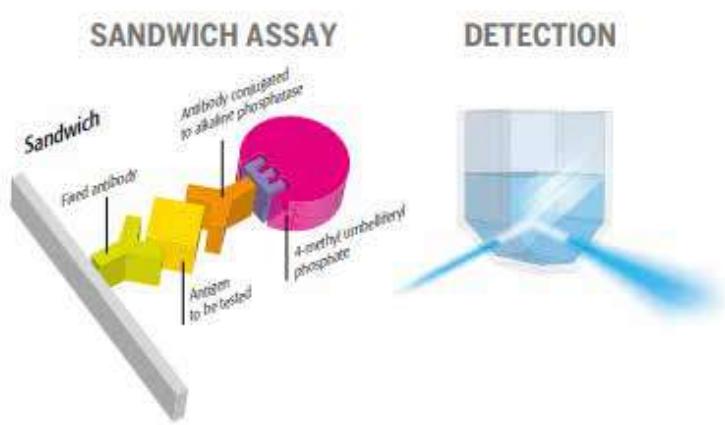


Figura 38 b. Esquema representativo del fundamento de la técnica de ELFA en muestras de alimentos (VIDAS®, bioMérieux S.A., Francia).

## 2. Técnicas moleculares

En Argentina se utilizan técnicas moleculares para la detección de ADN de microorganismos patógenos basadas en la amplificación de porciones constantes del genoma bacteriano. Los ensayos de ADN están sujetos a menor variabilidad comparados a los métodos fenotípicos. Los métodos moleculares permiten la detección de ADN específico de la bacteria blanco a partir de un número reducido de moléculas en la muestra. Además, no solo permiten detectar al patógeno, sino que también pueden detectar genes que codifican para otras proteínas involucradas en la patogenicidad (adhesinas, toxinas) que revisten importancia en la práctica microbiológica. Estas técnicas fueron desarrolladas para su utilización, no solo en la etapa de tamizaje, sino también para aplicar en las etapas de confirmación e identificación bacteriana. Entre los métodos rápidos moleculares disponibles en Argentina para el tamizaje de muestras cárnicas se encuentran las técnicas de PCR y amplificación isotérmica. En las Tablas 34-37 se presentan los kits moleculares disponibles en Argentina para tamizaje de STEC, *Salmonella* spp. y *Listeria* spp.

## 2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la generación de un gran número de copias de un fragmento específico de ADN. La cantidad de moléculas originales o ADN templado, al inicio es muy escaso, pero se incrementa exponencialmente durante la reacción, utilizandose en cada ciclo de amplificación los productos generados como nuevos templados. La amplificación del fragmento específico de ADN, a través de ciclos sucesivos de multiplicación exponencial, genera que la acumulación del producto pueda ser detectado. Cada ciclo de amplificación consiste en tres temperaturas, en las cuales los fragmentos de ADN experimentan diferentes procesos fisicoquímicos (desnaturalización, hibridación y extensión) con el fin de replicarse. A continuación se presenta un diagrama con los pasos de cada ciclo de amplificación con sus respectivas temperaturas de incubación: 1. Desnaturalización, 2. Hibridación y 3. Extensión.

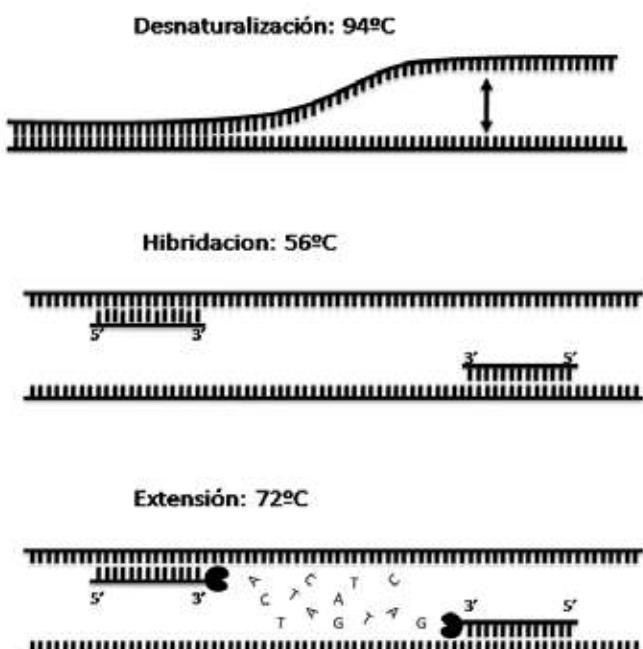


Figura 39. Etapas de un ciclo de amplificación en la técnica de PCR.

Las técnicas de PCR en Tiempo Real (PCR-TR) que se utilizan actualmente para el tamizaje y confirmación en el análisis de productos cárnicos, utilizan sondas marcadas con fluoróforos, que identifican una región específica del genoma bacteriano. La unión de una sonda a la región específica complementaria del genoma, desencadena una serie de reacciones que culminan con la detección por parte del termociclador de la fluorescencia emitida por el fluoróforo. Esta emisión es interpretada como señal positiva correspondiente a la presencia del gen buscado. La progresión de la PCR-TR puede visualizarse a través de la construcción de curvas de fluorescencia en el termociclador a medida en cada ciclo de reacción. Estas características le brindan alta especificidad y sensibilidad a la técnica y bajo límite de detección. Existen en el mercado diferentes kits de PCR-TR para su aplicación en el laboratorio de microbiología de los alimentos que tienen como finalidad la rápida detección de genes de bacterias. De acuerdo con la dependencia exclusiva o no a un termociclador específico, los kits pueden agruparse en kits cerrados y abiertos. Todos los kits incluyen controles internos de amplificación para detectar resultados indeterminados o inhibidos. En los kits cerrados se obtienen resultados en 1 a 2 h luego de un enriquecimiento de 18-24 h y son sencillos de interpretar (positivo o negativo). Estos kits permiten analizar varias muestras simultáneamente.

Todas las PCR son dependientes de equipos y requieren entrenamiento para su uso. En los kits abiertos la formación del analista incluye la interpretación de curvas. Es importante destacar que esta técnica posee riesgo de contaminación cruzada o *carryover*, ya que, por su alta sensibilidad, unas pocas moléculas de una amplificación previa pueden contaminar muestras negativas. Se desarrollaron varios protocolos con distinto grado de sofisticación para minimizar este riesgo, los cuales fue-

ron incluidos en algunos kits comerciales de PCR-TR.

### Kits de PCR-TR abiertos

Estos kits fueron validados para su uso en más de un modelo de termociclador. En general, requieren la interpretación de las curvas de fluorescencia por parte del usuario para poder informar si la muestra es positiva, negativa o inválida, requiriendo cierto entrenamiento del operario en la interpretación de curvas de fluorescencia (Tabla 34).

### Kits de PCR-TR cerrados

Dentro de este grupo se encuentran aquellos kits que deben ser utilizados con un termociclador específico para el que fueron validados. El termociclador tiene un software asociado que interpreta las curvas de fluorescencia y devuelve en la pantalla el resultado expresado como positivo, negativo o inválido. Esto evita la necesidad de contar con un analista capacitado en la lectura de curvas de fluorescencia. En contrapartida, genera la necesidad de depender exclusivamente de un equipo o de una familia de equipos de una marca específica (Tabla 35).

### Kits combinados de Inmunoconcentración y PCR-TR

Algunos kits se basan en estrategias combinadas de inmunoconcentración para aquellos microorganismos diana y posterior PCR-TR (Tabla 36).

## 2.2. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos

La amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP, por sus siglas en inglés “*Loop mediated isothermal amplification*”) al igual que la PCR, es un método rápido de detección molecular que tiene la capacidad de amplificar fragmentos específicos de ADN. La técnica LAMP utiliza cebadores específicos, pero a diferencia

de la PCR, requiere de varios pares que reconocen muchas regiones diferentes del genoma. Dado que utiliza una enzima ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena, esta técnica no requiere un paso de desnaturización, y toda la reacción ocurre a una misma temperatura (56°-65°C) en forma continua. La estrategia de emisión de luz que permite la visualización de las muestras positivas puede ser por bioluminiscencia (MDS®) o por fluorescencia (ANSR®). Los kits actualmente disponibles son cerrados. El software asociado al equipo interpreta la lectura de la bioluminiscencia o fluorescencia y presenta los resultados como positivos, negativos o inválidos, prescindiendo de la interpretación de curvas. En el MDS®, cuando ocurre la amplificación dada la presencia de ADN del microorganismo diana, se generan de manera exponencial Pirofosfatos Inorgánicos que son convertidos a Adenosin Tri Fosfato (ATP). Utilizando el ATP generado por la amplificación, una enzima luciferasa permite que se produzca bioluminiscencia, generando luz (señal positiva). La corrida completa dura 75 min aproximadamente. El ANSR®, utiliza como estrategia de detección sondas moleculares fluorescentes (molecular Beacons), que emiten fluorescencia cuando se unen a la secuencia de ADN diana, y el fluoróforo se aleja del apagador de fluorescencia. La corrida completa dura 18 min (Tabla 37).

**Tabla 34.** Kits de PCR-TR abiertos disponibles en Argentina para la búsqueda de STEC validados para carne bovina cruda\*.

MARCA	TARGET	EQUIPO	KIT	Nº	T°	CALDO <sup>1</sup>	INCUBACIÓN	DURACIÓN PCR	VALIDACIÓN	PROVEEDOR
Biotecon	<i>stx<sub>1</sub>,stx<sub>2</sub>, eae</i>	LightCycler® 480, LightCycler® 96, PikoReal 24 y otros	Foodproof® STEC screening LyoKit	96	2-8°C	CTS <sub>m</sub>	42±1°C 8-22 h	80 min	AOAC Carne cruda	Bioartis <a href="mailto:info@bioartis.com.ar">info@bioartis.com.ar</a>
	O26, O45, O103, O104, O111, O121, O145, O157	LightCycler® 480, LightCycler® 96, PikoReal 24 y otros	Foodproof® STEC Identification LyoKit	48	2-8°C	CTS <sub>m</sub>	42±1°C 8-22 h	80 min	AOAC Carne cruda	
	<i>E. coli</i> O157	Dualo 32® R2, LightCycler® 480, LightCycler® 96, PikoReal 24, Mx3005p, y otros	Foodproof® <i>E. coli</i> O157 Detection Kit	48	-25 a -15°C	CTS <sub>m</sub>	41,5°C±1°C 18-24 h	90 min	AOAC Carne de hamburguesa	
	<i>Salmonella</i>	Dualo 32®, Dualo 32® R2, LightCycler® 480, LightCycler® 96, PikoReal 24, Mx3005p y otros	Foodproof® <i>Salmonella</i> Detection Kit	96	-25 a -15°C	ISO 6579 BAM USDA	18-22 h	80 min	AOAC Carne picada cruda	
	<i>L. monocytogenes</i>	Dualo 32® R2, LightCycler® 480, LightCycler® 96, PikoReal 24, Mx3005p, y otros	Foodproof® <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Kit	96	-25 a -15°C	Half Fraser	30±1°C 24-48 h	80 min	AOAC Carne picada	

\* Previo al uso de un kit presente en esta tabla, con otra matriz, verificar su validación correspondiente en el certificado de validación correspondiente.

Nº: Número de análisis por kit.

T°: Temperatura de almacenamiento de reactivos.

<sup>1</sup> Caldo de enriquecimiento.

**Tabla 35.** Kits de PCR-TR cerrados disponibles en Argentina para la búsqueda de STEC, *Salmonella* y *Listeria* validados para carne bovina cruda\*.

EQUIPO	TARGET	KIT	Nº	T°	CALDO <sup>1</sup>	INCUBACIÓN	DURACIÓN PCR	VALIDACIÓN	PROVEEDOR
Applied Biosystems™, QuantStudio™ 5 Food Safety Real-Time PCR Instrument + Thermo Scientific™ RapidFinder™ Analysis Software v2.0 o posterior	<i>E. coli</i> O157:H7, stx <sub>1</sub> , stx <sub>2</sub> y eae	Thermo Scientific™ SureTect™ <i>Escherichia coli</i> O157:H7 PCR Assay	96	2-8°C	TSBm ABP	41,5±1°C 8-24 h	75 min	AOAC carne cruda	Thermo Fisher tabata.quiroz@thermo-fisher.com
	O103, O26, O145, O111, O121, O45	SureTect™ <i>Escherichia coli</i> STEC Identification PCR Assay	96	2-8°C	TSBm ABP	41,5±1°C 8-24 h	75 min	AOAC carne cruda	
	<i>Salmonella</i> spp.	Thermo Scientific™ SureTect™ <i>Salmonella</i> species PCR Assay	96	2-8°C	ABP	41,5±1°C 9-24 h	75 min	AOAC carne picada cruda	Thermo Fisher tabata.quiroz@thermo-fisher.com
		Thermo Scientific™ SureTect™ <i>Listeria monocytogenes</i> PCR Assay	96	2-8°C	24 LEB	37±1°C 20-28 h	75 min	AOAC carne picada cruda	
Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR Instrument + Applied Biosystems™ RapidFinder™ Express Software v2.0 o posterior	<i>Listeria</i> spp.	Thermo Scientific™ SureTect™ <i>Listeria</i> species PCR Assay	96	2-8°C	24 LEB	37±1°C 22-30 h	75 min	AOAC Carne picada cruda	
BAX® System Q7 cycler	<i>E. coli</i> O157:H7	Real-Time <i>E.coli</i> O157:H7 EXACT	96	2-8°C	BAX® System MP media TSBm	42°C, 8-24 h	60 min	AOAC Carne cruda	Bioartis info@bioartis.com.ar
		Real-Time <i>E. coli</i> O157:H7	96	2-8°C	BAX® System MP media	42°C, 8-24 h	60 min	AOAC Carne cruda	
		<i>E. coli</i> O157:H7 MP	96	2-8°C	BAX® System MP media	42°C, 8-24 h	60 min	AOAC Carne cruda	
	stx, eae, O26, O111, O121, O45, O103, O145	BAX® System Real-Time PCR Assays STEC Suite: -Screening Assay -for stx and eae - Panel 1 Assay - for <i>E. coli</i> O26, O111, O121 - Panel 2 Assay -for <i>E. coli</i> O45, O103, O145	96 (Screening) 48 (Panel 1 y 2)		TSBm+noboviocina (2mg/L) Medio MP	41°C, 12-24 h	60 min	AOAC Carne cruda	
	<i>Salmonella</i> spp.	Real-Time PCR Assay for <i>Salmonella</i> spp	96	2-8°C	APB	35°C, 20-24 h	60 min	AOAC Carne cruda	
		Real-Time PCR Assay for <i>Salmonella</i> 2	96	2-8°C	ABP	35°C, 20-24 h	60 min	AOAC Carne cruda	
	<i>Listeria</i> spp.	Real-time Genus <i>Listeria</i>	96	2-8°C	24 LEB	37°C, 24-28 h	60 min	AFNOR Carne cruda	
		Genus <i>Listeria</i> 24E	96	2-8°C	24 LEB	37°C, 24-28 h	60 min	AFNOR Carne cruda	
	<i>L. monocytogenes</i> (excepto <i>L. grayi</i> )	<i>L. monocytogenes</i> 24E L. mono	96	2-8°C	24 LEB	37°C, 24-28 h	60 min	AFNOR Carne cruda	
		Real-Time <i>L. monocytogenes</i>	96	2-8°C	24 LEB	37°C, 24-28 h	60 min	AFNOR Carne cruda y ambiente	
GENE-UP®	<i>Salmonella</i>	GENE-UP® <i>Salmonella</i> (SLM2)	192	2-25°C	ABP (a temperatura Ambiente)	42±1°C 18-24 h	60 min	AOAC Carne cruda	bioMérieux consultas.ar@biomerieux.com
	<i>Listeria</i> spp. (excepto <i>L. grayi</i> )	GENE-UP® <i>Listeria</i> 2 (LIS 2)	192	2-25°C	Caldo LPT	37±1°C 22-24 h (18-24 horas para muestras ambientales)	60 min	AFNOR Carne y ambiente	

EQUIPO	TARGET	KIT	Nº	T°	CALDO1	INCUBACIÓN	DURACIÓN PCR	VALIDACIÓN	PROVEEDOR
GENE-UP®	<i>L. monocytogenes</i>	GENE-UP® <i>Listeria monocytogenes</i> 2 (LMO 2)	192	2-25°C	Caldo LPT	22-24 h a 37±1°C (18-24 horas para muestras ambientales)	60 min	AFNOR Carne y ambiente	bioMérieux consultas.ar@biomerieux.com
iQ-Check	<i>stx<sub>1</sub> + stx<sub>2</sub> + eae</i>	Sistemas de PCR-TR Bio-Rad iQ-Check STEC VirX	94	2-8°C	ABP	41,5±1°C 8-22 h		AOAC Carne cruda y ambiente	Tecnolab info@tecnolab.com.ar
	O26, O111, O45, O145, O121 y O103 y <i>E. coli</i> O157:H7.	Sistemas de PCR-TR Bio-Rad iQ-Check™ SerO II	32	2-8°C	ABP	41,5±1°C 8 -22 h		AOAC Carne cruda y ambiente	
	<i>E. coli</i> O157:H7	Sistemas de PCR-TR Bio-Rad iQ-Check E. coli O157:H7 PCR Detection Kit	94	2-8°C	ABP	41,5±1°C 8-24 h		AOAC Carne cruda y ambiente	
	<i>Salmonella</i>	Sistemas de PCR-TR Bio-Rad iQ-Check™ <i>Salmonella</i> II Kit	96	2-8 °C	APB	37°C 10-21 h		AOAC carne cruda	
	<i>Listeria</i> spp.	Sistemas de PCR-TR Bio-Rad iQ-Check™ <i>Listeria</i> species	96	2-8 °C	<i>Listeria</i> Special Broth	30±1°C 23-25 h		AFNOR carne cruda	
	<i>L. monocytogenes</i>	Sistemas de PCR-TR Bio-Rad iQ-Check™ <i>Listeria monocytogenes</i> II	96	2-8 °C	<i>Listeria</i> Special Broth o Half fraser	30±1°C 23-25 h o 30±1°C 25±1 h		AFNOR carne cruda	

\*Previo al uso de un kit presente en esta tabla, con otra matriz, verificar su validación correspondiente en el certificado de validación correspondiente.

Nº: Número de análisis por kit.

T°: Temperatura de almacenamiento de reactivos.

1 Caldo de enriquecimiento.

**Tabla 36.** Kits de PCR-TR combinados con inmunoconcentración disponibles en Argentina para la búsqueda de STEC, *Salmonella* y *Listeria* validados para carne bovina cruda\*.

EQUIPO	TARGET	KIT	Nº	T°	CALDO <sup>1</sup>	INCUBACIÓN	DURACIÓN	VALIDACIÓN	PROVEEDOR
Assurance® GDS Rotor-Gene® thermocycle ®	STEC O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157)	Assurance GDS® for MPX Top 7 STEC <sup>3</sup>	36	2-8°C	mEHEC	37°C, 10-18 h	80 min	AOAC Carne cruda	bioMérieux consultas.ar@biomerieux.com
	STEC O26, O45, O103, O111, O121, O145	Assurance GDS® MPX ID for Top STEC (MPX ID) <sup>4</sup>	36	2-8°C	mEHEC	37°C, 10-18 h	80 min	AOAC Carne cruda	
	<i>E. coli</i> O157:H7	Assurance® GDS <i>E. coli</i> O157:H7 Tq	36	2-8°C	mEHEC	37°C, 10-18 h	80 min	AOAC Carne cruda	
	Salmonella	Assurance GDS™ Salmonella	36	5±3°C	mEHEC ABP	42°C, 8-24 h	80 min	AOAC Carne cruda	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Assurance GDS <i>Listeria monocytogenes</i> Tq	36	2-8°C	Caldo Half Fraser	30°C, 22-26 h	50 min	MicroVal Carne	
Solución STEC BioMérieux5VIDAS® MINI VIDAS®	<i>E. coli</i> O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157	VIDAS® UP <i>E. coli</i> Serogroups (ESPT)	60	2-8°C	ABP	41,5 ±1°C 10-24 h		AOAC Carne cruda	bioMérieux consultas.ar@biomerieux.com
GENE-UP®	<i>stx</i> <sub>1</sub> , <i>stx</i> <sub>2</sub> y <i>eae</i>	GENE-UP® STEC - <i>stx</i> & <i>eae</i> 2 (EH1 2)	192	2-25°C	ABP	41,5 ±1°C 10-24 h		AOAC Carne cruda	
	<i>E. coli</i> O26, O45, O103, O111, O121 y O145.	GENE-UP® STEC-Top 6 GENE-UP® O157:H7	24 192	2-8°C 15-25°C	ABP	41,5 ±1°C 10-24 h		AOAC Carne cruda	
	<i>E. coli</i> O26, O45, O103, O111, O121 y O145.	GENE-UP® STEC – Top 6	24	2-8°C	ABP	41,5 ±1°C 10-24 h		AOAC Carne cruda	
	<i>E. coli</i> O157:H7	GENE-UP® <i>E. coli</i> O157:H7	192	15-25°C	ABP	41,5 ±1°C 10-24 h		AOAC Carne cruda	
	<i>E. coli</i> O157:H7	GENE-UP® <i>E. coli</i> O157:H7 2 (ECO 2)	192	2-25°C	ABP	41,5 ±1°C 10-24 h		AOAC Carne cruda MicroVal ambiente	

\*Previo al uso de un kit presente en esta tabla, con otra matriz, verificar su validación correspondiente en el certificado de validación correspondiente.

Nº: Número de análisis por kit.

T°: Temperatura de almacenamiento de reactivos.

1. Caldo de enriquecimiento.

2. Combina una plataforma de inmunoconcentración (familia de equipos VIDAS®) con PCR-TR (GENE-UP®).

3. Assurance GDS® Top 7 STEC (*eae*) Tq y Assurance GDS® Shiga Toxin Genes (Top 7) Tq.

4. Assurance® GDS MPX ID está diseñado para usarse como ensayo secundario, para confirmar resultados positivos a STEC por Assurance® GDS MPX Top 7. Este ensayo no detecta *E. coli* O157:H7.

5. Combina una plataforma de inmunoconcentración (familia de equipos VIDAS®) con PCR-TR (GENE-UP®).

**Tabla 37.** Kits LAMP disponibles en Argentina para la búsqueda de STEC, *Salmonella* y *Listeria* validados para carne bovina cruda\*.

EQUIPO	TARGET	KIT	Nº	T°	CALDO <sup>1</sup>	INCUBACIÓN	DURACIÓN	VALIDACIÓN	PROVEEDOR
Sistema de Detección Molecular 3M™	<i>E. coli</i> O157:H7	3M™ Ensayo de Detección Molecular 2 - <i>E.coli</i> O157 (incluyendo H7)	96	2-8°C	ABP	41,5±1°C, 10-18 h	117 min	AOAC Carne	Neogen: pedidosAR-G@neogen.com
	<i>stx</i>	3M™ Ensayo de Detección Molecular 2- STEC ( <i>stx</i> )	96	2-8°C	3M APB ISO	10-18 h	117 min	AOAC Carne	
	<i>stx y eae</i>	3M™ Ensayo de Detección Molecular 2- STEC ( <i>stx y eae</i> )	48	2-8°C	3M APB ISO	10-18 h	117 min	AOAC Carne	
	<i>Salmonella</i>	3M™ Ensayo de Detección Molecular 2- (MDA2) - <i>Salmonella</i>	96	2-8°C	ABP	41,5°C 10-24 h	117 min	AOAC Carne y ambiente	
Neogen ANSR reader <sup>2</sup>	<i>E. coli</i> O157:H7	ANSR® for <i>E. coli</i> O157:H7	96	2-8°C	Caldo de enriquecimiento de ANSR para <i>E. coli</i> TSBm	12-26 h	60 min	AOAC carne	Neogen: pedidosAR-G@neogen.com
	<i>Salmonella enterica y bongori</i>	ANSR™ para <i>Salmonella</i>	96	2-8°C	Caldo de enriquecimiento ANSR para <i>Salmonella</i>	10-26 h	60 min	AOAC carne	
	<i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> spp	ANSR para <i>Listeria</i>	96	2-8°C	BLEB (carne)	16-26 h	60 min	AFNOR Carne y ambiente	

\* Previo al uso de un kit presente en esta tabla, con otra matriz, verificar su validación correspondiente en el certificado de validación correspondiente.

T°: Temperatura de almacenamiento de reactivos.

1. Caldo de enriquecimiento.

2. La capacidad del equipo es de 16 tubos por corrida.

# CAPÍTULO IX

## MONITOREO AMBIENTAL Y SU IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA ALIMENTICIA

*Patricia Angélica Barril y Juan Martín Oteiza*

Laboratorio de microbiología de los alimentos,  
Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI),  
Neuquén, Argentina.

El aseguramiento de la inocuidad de un alimento debe contar con un sistema de control e inspección que utilice mecanismos y metodologías tendientes a identificar, cuantificar y evaluar los peligros potenciales de contaminación en producción.

Los sistemas clásicos de inocuidad y calidad de los alimentos se basaban principalmente en el concepto de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), el cual posee un enfoque sistémico y preventivo para la identificación, evaluación y control de los riesgos asociados con peligros en las áreas de producción de alimentos. El sistema APPCC hace hincapié en la identificación de Puntos Críticos de Control (PCC) en un proceso de producción de alimentos, donde se puede aplicar un control para prevenir o reducir los riesgos a un nivel aceptable. En este contexto, se verifican los POES y la eficiencia de los agentes limpiadores y desinfectantes. Sin embargo, la ICMSF reconoció que la aplicación óptima de un plan APPCC, no brinda garantías de que pueda ocurrir una recontaminación en el entorno de procesamiento. A pesar del control estricto de todos los PCC en un proceso, los alimentos pueden contaminarse posteriormente ya sea a través del agregado de un ingrediente contaminado o por el entorno de procesamiento.

Diversas organizaciones e instituciones regulatorias vinculadas a la inocuidad alimentaria reconocieron que el control del ambiente de producción es una herramienta que contribuye a la aptitud de los alimentos y evitar su recontaminación.

La implementación de un **Programa de Monitoreo Ambiental (PMA)** en la industria alimenticia tiene como objetivo evaluar las condiciones ambientales de las áreas de producción, procesamiento y almacenamiento de alimentos, con el fin de prevenir la contaminación ambiental del producto terminado. Este enfoque preventivo se puede

utilizar como un indicador de alerta temprana de posible contaminación, y debería complementar los planes de muestreo de producto terminado normalmente aplicados en la industria (que funcionan de manera reactiva y no preventiva). De hecho, un PMA eficiente, que incluya un muestreo ambiental repetido y un proceso controlado y validado será más confiable que un control exhaustivo solo del producto final. Por otra parte, el monitoreo ambiental puede incluir la implementación de programas de control de plagas y de higiene en las instalaciones, la realización de inspecciones y auditorías de calidad y seguridad, como así también la implementación de medidas de prevención y control de la contaminación. De esta manera, la implementación de un PMA permite no sólo evaluar, de manera global, la efectividad de las prácticas generales de higiene y desinfección en una instalación, sino también evaluar múltiples programas, incluyendo el diseño sanitario, prácticas de personal, métodos operacionales y control de proveedores entre otros, proporcionando así la información necesaria para prevenir posibles contaminaciones de los productos alimenticios.

## A. BENEFICIOS DEL PLAN DE MONITOREO AMBIENTAL

En la Figura 40 se muestran algunos de los beneficios que se buscan al momento de implementar un PMA.



Figura 40. Beneficios de la implementación de un plan de monitoreo ambiental.

Cabe destacar, que el plan de monitoreo ambiental no está diseñado para validar la eficacia de los métodos de limpieza y desinfección, sino que se centra en la validación de las frecuencias requeridas para la limpieza y saneamiento, y en todos los programas de BPM.

## B. DISEÑO DE UN PLAN DE MONITOREO AMBIENTAL

Como se mencionó anteriormente, el monitoreo ambiental no es un instrumento de control, sino que es una verificación de que todos los programas relacionados a la seguridad alimentaria son efectivos (Figura 41).

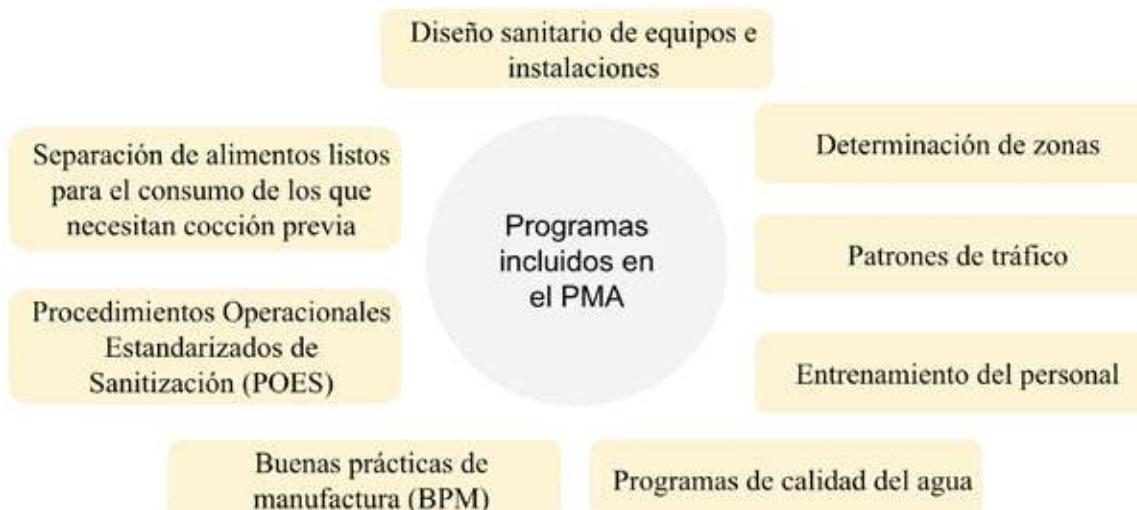


Figura 41. Programas relacionados a la seguridad alimentaria incluidos en el PMA.

Un PMA debe ser cuidadosamente diseñado después de evaluar la planta de producción, así como sus productos. Diferentes industrias alimenticias con diversos productos alimenticios (por ejemplo, de origen animal, instalaciones de tratamiento en seco o húmedo) pueden requerir de diferentes PMA. Por lo que un PMA es espe-

cífico de una planta en particular, y de las líneas de producción individuales dentro de una planta. Un PMA no debe replicarse con exactitud en otro establecimiento. El desarrollo de un PMA supone múltiples pasos. En la Figura 42 se describe un posible marco de trabajo a seguir para diseñarlo de manera correcta.

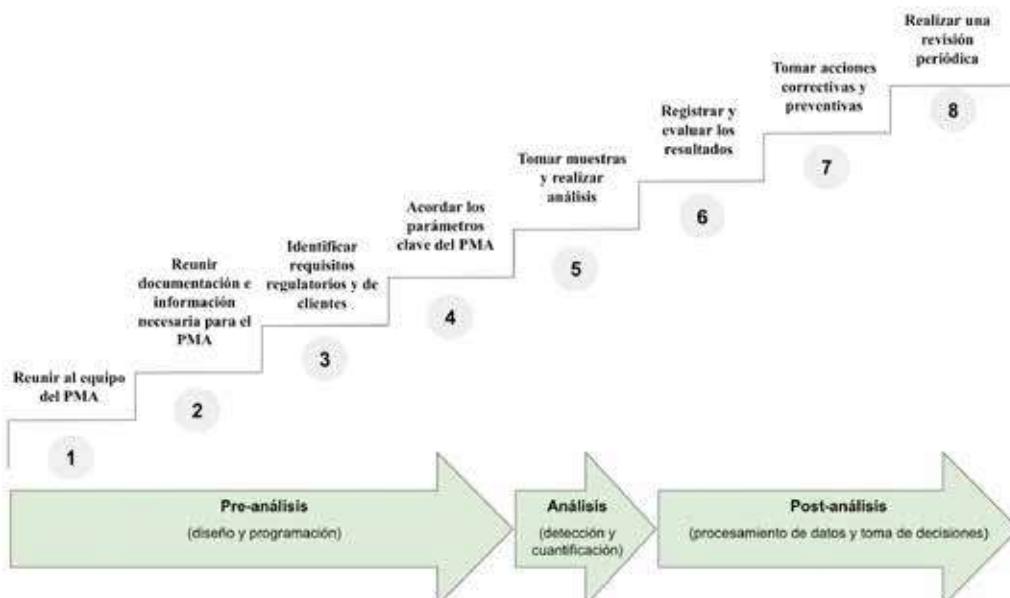


Figura 42. Pasos claves para el desarrollo de un PMA.

Los pasos claves a seguir para el desarrollo de un correcto PMA se detallan a continuación:

**1. Reunir al equipo encargado del diseño e implementación del PMA.** La primera tarea en la implementación de un PMA consiste en reunir a personas idóneas, familiarizadas con la industria, que ayuden a identificar posibles áreas de riesgo y preocupación en la planta. Este grupo debe ser interdisciplinario, y debe incluir representantes del área de calidad, producción, laboratorio, higiene y seguridad y gerencia entre otros. En caso de que la planta procesadora de alimentos no cuente con un experto en desarrollo e implementación de un PMA, se recomienda contactar a uno externo para recibir orientación.

**2. Reunir documentación e información necesaria para el PMA.** Una vez formado el equipo interdisciplinario, es necesario reunir la documentación e información necesaria para el desarrollo del programa, tal como planos de la planta, detalle de las áreas de producción, equipos, plano de desagües, y resultados de programas o monitoreos ambientales implementados con anterioridad, entre otros.

**3. Identificar requisitos regulatorios y de clientes.** En caso de que existan, debe incluirse la identificación de documentos sobre requisitos tanto regulatorios como de clientes.

**4. Acordar los parámetros claves.** Se debe incluir el análisis de peligros (definiendo microorganismos patógenos, indicadores y alterantes), la descripción de cada una de las zonas en las que dividió la planta (zonificación), los puntos de muestreo, la cantidad de muestras a ser recolectadas, la frecuencia de muestreo, el momento de la toma de muestras (antes o durante la operación), el método de recolección de las muestras (esponja, hisopo), el lugar donde

se procesarán las muestras (laboratorio interno o externo), y las metodología que se aplicarán para el análisis de las muestras. En la Figura 43 se detallan algunas de las preguntas que son necesarias realizar previo a la definición de los parámetros claves de un PMA.



¿Por qué?	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cumplir estándares</li><li>• Tomar decisiones de limpieza</li><li>• Tomar decisiones sobre el producto</li><li>• Otras actividades</li></ul>
¿Dónde?	<ul style="list-style-type: none"><li>• Materia prima</li><li>• Producto en proceso</li><li>• Producto terminado</li><li>• Superficies y ambientes</li><li>• Otros</li></ul>
¿Qué?	<ul style="list-style-type: none"><li>• Microorganismos patógenos</li><li>• Microorganismos alterantes</li><li>• Microorganismos indicadores</li><li>• Alérgenos</li></ul>
¿Cómo?	<ul style="list-style-type: none"><li>• Metodología de muestreo</li><li>• Metodología de análisis</li><li>• Cantidad de muestras</li></ul>
¿Cuándo?	<ul style="list-style-type: none"><li>• Antes de iniciar la producción</li><li>• Durante la producción</li><li>• Despues de la producción</li></ul>
Otras consideraciones	<ul style="list-style-type: none"><li>• Frecuencia</li><li>• Límites aceptables</li></ul>

Figura 43. Interrogantes que deben considerarse para el desarrollo de un adecuado PMA.

**5. Tomar muestras y realizar análisis.** Teniendo en cuenta que el objetivo del monitoreo ambiental es detectar posibles fuentes de contaminación, la toma de muestras suele enfocarse en áreas de mayor riesgo, donde el muestreo se realizará también con una frecuencia mayor. Dependiendo de la muestra tomada, se debe realizar análisis de verificación de limpieza y desinfección (por ejemplo, herramientas de bioluminiscencia) y determinaciones de microorganismos (indicadores, de deterioro o patógenos).

**6. Registrar y evaluar los resultados.** Deben registrarse los resultados obtenidos del análisis de las muestras y los procedimientos operativos realizados.

**7. Tomar acciones correctivas y preventivas.** Debe dejarse registrado, por escrito, el seguimiento de los resultados positivos con el detalle de las medidas correctivas

que se llevaron adelante como así también la descripción de las medidas a tomar para prevenir la aparición de nuevos resultados positivos. Asimismo, deben asignarse las tareas a personas específicas con un registro escrito de estas asignaciones.

**8. Realizar una revisión periódica del diseño del PMA.** Periódicamente (Por ejemplo: 6 a 12 meses), el equipo a cargo del PMA debe reunirse para realizar una revisión de los planes de muestreo, los resultados obtenidos, y las medidas correctivas implementadas (Figura 44).



Figura 44. Gestión del PMA.

Según BRCGS (Versión 9), la empresa deberá revisar el PMA, al menos de forma anual y siempre que se produzcan:

- Cambios en las condiciones de procesamiento, flujo de proceso o equipos que pudieran afectar el mismo.
- Nuevos avances en la información científica (Por ejemplo, nuevos patógenos de interés).
- Imposibilidad de los programas de identificar un problema importante (Por ejemplo, pruebas de las autoridades regulatorias que identifiquen resultados positivos que el programa del establecimiento no identificó).
- Fallas de productos (productos con resultados de pruebas positivos).
- Resultados negativos constantes (Por

ejemplo, un establecimiento con una larga historia de resultados negativos debe revisar su programa para considerar si se están evaluando las partes pertinentes de la fábrica, si las pruebas se están realizando correctamente, si las pruebas son para los organismos adecuados, etc.).

## C. IMPLEMENTACIÓN DEL PLAN DE MONITOREO AMBIENTAL

Si bien no existe un marco universalmente reconocido para la implementación de un PMA, se podrían aplicar algunos posibles enfoques que parecerían lógicos y coherentes con otros aspectos de la gestión de la inocuidad y la calidad de los alimentos, como el APPCC. En este sentido, se debería comenzar con una identificación de los “peligros” relacionados con la inocuidad y la calidad de los alimentos elaborados para los cuales exista evidencia científica que avale que los mismos sean capaces de transmitirse a través del ambiente de la planta de procesamiento.

### 1) EVALUACIÓN DE RIESGO ESPECÍFICO DE LA INSTALACIÓN: ANÁLISIS DE MICROORGANISMOS EN EL AMBIENTE

Las plantas deben identificar los peligros biológicos relacionados con inocuidad y calidad de los alimentos que pueden introducirse en el producto desde el ambiente de la planta de procesamiento. Para ello se debe tener en cuenta no solo la presencia de microorganismos patógenos, sino también indicadores (los cuales dan indicio de las condiciones higiénicas de la planta y la potencial contaminación fecal y/o presencia de patógenos entre otros), y de deterioro.

#### 1.1. Monitoreo de microorganismos patógenos.

Son escasos los microorganismos patógenos para los cuales existe evidencia científica que demuestre su relación con el ambiente de producción. Los

patógenos clave a los que deben dirigirse los PMA en una planta frigorífica bovina son *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., y otros patógenos incluidos en la familia *Enterobacteriaceae* (por ejemplo, STEC). Algunos de estos microorganismos presentan la capacidad de formar biofilms, los cuales consisten en comunidades microbianas asociadas a superficies atrapadas en una matriz exopolimérica, donde pueden persistir y sobrevivir a los procedimientos de desinfección.

La carne, puede contaminarse con diversos microorganismos provenientes del ambiente, incluido patógenos, durante diferentes etapas de su procesamiento, como por ejemplo el desposte. En estos casos, el patógeno más relevante resulta ser *Salmonella*, de ahí que los diferentes gobiernos en el mundo establecieron programas para la reducción de este microrganismo. En el caso de productos procesados (derivados cárnicos cocidos o fermentados), el patógeno de interés sería *L. monocytogenes* dada las características de los mismos, del proceso de elaboración y del microorganismo.

## 1.2. Monitoreo de microorganismos indicadores.

Los microorganismos indicadores aportan una visión más amplia de la presencia microbiana en el entorno de trabajo que los análisis orientados a la búsqueda de microorganismos específicos. El enfoque en el que se basa el uso de estos microorganismos es considerar que, si el entorno de procesamiento está bajo control (desde el punto de vista de la higiene), el número de microorganismos indicadores también estará bajo control. Es muy valioso para validar y verificar los procedimientos de higienización.

Algunos de los microorganismos indicadores comúnmente incluidos en un PMA son: bacterias aerobias mesófilas,

*Enterobacteriaceae*, coliformes y en algunos casos *E. coli*.

## 1.3. Monitoreo de microorganismos de deterioro.

Los microorganismos de deterioro, o alterantes, producen un cambio en las características organolépticas de los alimentos. Suelen ser microorganismos indicadores, que no representan un peligro directo para la salud, y son útiles para indicar las prácticas inadecuadas de higiene durante el proceso de producción. El monitoreo ambiental permite a las empresas adoptar un enfoque proactivo con respecto a la descomposición microbiana, en lugar de abordar las fallas de manera retrospectiva a medida que se producen. Los incidentes de deterioro pueden ocasionar una disminución de la vida útil, de las propiedades organolépticas e inclusive causar el retiro de productos debido a reclamos de clientes lo cual puede representar importantes consecuencias económicas y de percepción para los consumidores. Las plantas deben considerar qué microorganismos deterioradores son más pertinentes según el producto elaborado. En general para el estudio de este tipo de microorganismos se utilizan indicadores como los hongos y levaduras, bacterias aerobias mesófilas, aerobios mesófilos, bacterias ácido lácticas y *Pseudomonas*. Sitios como puntos ciegos en tuberías, cintas transportadoras, aspas de ventiladores, depósitos de agua en zonas de refrigeración, conductos de entrada y salida de aire, sellos o juntas de refrigeradores, entre otros son áreas de la planta propensas a albergar microorganismos de deterioro.

En la Tabla 38 se presenta un resumen de los principales microorganismos de interés para un PMA en plantas de desposte y productos procesados.

**Tabla 38.** Principales microorganismos de interés en para un PMA en plantas de despoche y productos procesados.

Microorganismos	Planta de despoche	Planta de productos procesados
Patógenos	<i>Salmonella</i> spp. STEC	<i>L. monocytogenes</i> (En el caso de embutidos fermentado <i>Salmonella</i> spp.)
Indicadores	Coliformes totales o <i>Enterobacteriaceae</i>	Coliformes totales o <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Listeria</i> spp.
De deterioro	<i>Pseudomonas</i> spp.	Bacterias ácido lácticas

## 2) ZONIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO

En la implementación del PMA resulta fundamental que en las plantas alimenticias se definan zonas según su nivel de riesgo de contaminación. En la Figura 45 se muestran las cuatro zonas en las que se pueden dividir las instalaciones según su mayor (zona 1) o menor (zona 4) riesgo de contaminación.

- **Zona 1:** superficies de contacto directo (o indirecto) con el producto elaborado, materia prima o ingrediente, antes de que sea sellado en su envase original. Algunos ejemplos: cuchillos, ganchos, rebanadoras, picadoras, cintas transportadoras, rampas de descarga, mesas para pelar, tablas, bandejas, vainas, cierras, estantes, mesas de trabajo, manos o guantes de los manipuladores, entre otros.

- **Zona 2:** superficies ambientales inmediatamente adyacentes a las superficies en contacto con el producto que bajo condiciones normales no entran en contacto directo con el producto o las superficies de contacto del producto del recipiente, incluido el exterior de los equipos. Por ejemplo, estructura de equipos (bordes, patas, ruedas), paneles de control, monitores y

teclados de computadora, cañerías aéreas y bandejas portacables (dependiendo de la ubicación), desagües (ubicados debajo de sitios considerados como zona 1), pisos y paredes cercanos a los productos expuestos (a menos de 1 m del producto expuesto), enfriadores, armazones, bastidores de equipos, recipiente de residuos.

- **Zona 3:** superficies sin contacto con producto. Superficies ambientales dentro de la zona de proceso, pero más alejadas de la zona de contacto con producto que, si se contaminan, pudiesen razonablemente contaminar las superficies de contacto con producto (contaminación cruzada). Algunos ejemplos son: elementos de limpieza (escobas, palas, mopas), carros, montacargas, drenajes, ventiladores de aire, pallets, limpia calzados, pisos y paredes (a más de 1 m del producto expuesto), teléfonos, cajetillas de mano, matafuegos, lavamanos, escaleras, plataformas, cañerías aéreas, bandejas portacables (dependiendo de la ubicación), lavaderos, cortinas plásticas, entre otros.

- **Zona 4:** áreas exteriores a las salas de procesamiento que puedan generar impacto en las áreas productivas por el movimiento de personas, equipamiento y/o materiales. Por ejemplo, pasillos, baños y vestidores, cafetería, cuartos de descanso, depósitos, taller de mantenimiento, oficinas, laboratorio, comedor, sanitarios, oficinas.



**Figura 45.** División del Programa de Monitoreo Ambiental en zonas (zonificación).

Existen casos en los que, dependiendo de las condiciones, un punto de muestreo que no presenta contacto directo con el producto elaborado podría ser considerado en más de una zona. Estos puntos forman parte de las zonas 2 y 3, y podrían ser considerados dentro de la zona 1. Por citar un ejemplo: vigas, pasarelas, techos, cubiertas, conductos, tuberías, unidades de aire acondicionado que se encuentren directamente por encima de la superficie de contacto del producto. El equipo de evaluación debe determinar si este tipo de superficies constituyen una superficie de la zona 1. Esta determinación dependerá de un número de factores, entre ellos la posibilidad de que la superficie contamine el producto que esté debajo (por ej., la presencia de agua de condensado, acumulación de polvo, etc.), la capacidad de limpiar y desinfectar eficazmente la superficie regularmente, entre otros. Esto hace referencia a que el PMA debe ser considerado con un enfoque dinámico.

Una vez que se definieron las zonas dentro de la planta, se deben seleccionar los diferentes puntos de muestreo dentro de cada una de ellas. Esta selección debe incluir zonas de difícil acceso y limpieza (por ejemplo, partes aéreas de la planta), que son los posibles nichos de crecimiento microbiano, así como también zonas de alto tráfico y vías que puedan facilitar el traslado de microorganismos a lo largo de la planta. El muestreo ambiental en busca de patógenos se debe realizar de manera rutinaria en las zonas 2, 3 y 4. Las superficies dentro de la zona 1 normalmente deben ser analizadas en busca de microorganismos indicadores (*Enterobacteriaceae*, coliformes totales, entre otros). Solo en situaciones especiales, un muestreo de investigación debido a eventos potenciales de contaminación se recomienda analizar patógenos en muestras de zona 1; por ejemplo, una gotera en el techo o un resultado positivo de *Salmonella* spp. en un

producto terminado. Un resultado positivo para un patógeno en muestras de zona 1 debería estar acompañado de un programa de retención del producto elaborado. Por otra parte, un resultado positivo para *Enterobacteriaceae*, u otros indicadores apropiados, en muestras de zona 1 evita la necesidad de un programa de retención del producto terminado, pero debería activar un protocolo de análisis de causa raíz.

### 3) FRECUENCIA DE MUESTREO Y NÚMERO DE MUESTRAS

La orientación estándar sobre cómo definir la frecuencia de muestreo y el número de muestras (programa de muestreo) sugiere que ambos valores deben determinarse “en función del riesgo”. Esta definición no suele ser muy útil, ya que hay pocos documentos de orientación que especifiquen cómo evaluar cuantitativamente el riesgo asociado a los patógenos ambientales.

La frecuencia de muestreo de microorganismos patógenos e indicadores debe basarse en el riesgo y tener en cuenta el tipo de producto que se elabora (listo para el consumo, listo para cocinar o crudo; con actividad de agua alta o baja), el nivel de riesgo en cada etapa del proceso y otras consideraciones específicas del entorno de elaboración:

- Letalidad del procesamiento.
- Frecuencia de saneamiento.
- Características de las plantas.
- Potencial de contaminación cruzada.

En el marco del *Codex Alimentarius*, los componentes básicos de una evaluación de riesgos son: i) Identificación de los peligros; ii) Caracterización de los peligros; iii) Evaluación de la exposición; y iii) Caracterización del riesgo; siendo el riesgo la probabilidad de que un peligro no sea controlado en una etapa del proceso y afecte así la inocuidad del alimento.

La estimación del riesgo se obtiene mediante la combinación de experiencias, la revisión de los reclamos de clientes, devolución de productos, resultados de análisis de laboratorio, datos epidemiológicos locales o regionales e información bibliográfica específica sobre agentes de ETA. Teniendo como base la definición de los peligros más importantes y una evaluación de riesgo detallada, es necesario un estudio específico del producto y del fluograma de su producción de manera que se contemple la cercanía del sitio de monitoreo al producto terminado, la potencial contaminación cruzada, la facilidad o dificultad de acceso para la limpieza y el análisis, como

así también los años de los equipos, los sustratos y las condiciones de las superficies. Este análisis de riesgo será específico para cada producto y línea de producción, debiendo ser revisado siempre que existan modificaciones en las materias primas, formulaciones, condiciones de proceso, material de embalaje o en el uso esperado para el producto. Así, es posible clasificar el riesgo en bajo, moderado o alto.

En la tabla 39 se describe las frecuencias de muestreo sugeridas en diferentes zonas de la planta productora de alimentos, en función del riesgo, considerando la probabilidad de ocurrencia de un peligro y la gravedad de sus consecuencias.

**Tabla 39.** Frecuencias de muestreo sugeridas según el riesgo de contaminación.

SEVERIDAD DEL PELIGRO		PROBABILIDAD DE OCURRENCIA DEL PELIGRO		
		Baja	Media	Alta
Alto (Zona 1)	Frecuencia de muestreo SEMANAL/MENSUAL	Frecuencia de muestreo ALTA	Frecuencia de muestreo ALTA	
Moderado (Zonas 2 y 3)	Frecuencia de muestreo BAJA	Frecuencia de muestreo SEMANAL/MENSUAL	Frecuencia de muestreo ALTA	
Bajo (Zona 4)	Frecuencia de muestreo BAJA	Frecuencia de muestreo BAJA	Frecuencia de muestreo SEMANAL/MENSUAL	

Color: nivel de riesgo

Por lo general, las plantas elaboradoras de alimentos listos para su consumo (RTE, por sus siglas en inglés) donde no se aplica ningún tratamiento posterior al envasado, ni previo al consumo del alimento, se consideran de riesgo alto. Es preciso realizar, al menos, un muestreo semanal de microorganismos patógenos en el ambiente al que se exponen los alimentos (específicamente *L. monocytogenes*), antes de su envasado final. Inicialmente, es recomendable realizar muestreos intensivos, de manera tal de contar con información detallada de la planta, y posteriormente definir la frecuencia por sector o zona. Por ejemplo, la frecuencia del muestreo puede reducirse

a quincenal/mensual cuando se evidencie objetivamente que el riesgo de contaminación es bajo.

Por otra parte, para establecer la frecuencia de muestreo se debe tener en cuenta la dificultad de limpieza de los equipos y superficies y el riesgo que esto conlleva. En base a esto, los mismos se pueden dividir de acuerdo con el riesgo (alto, medio, bajo). Así dos equipos presentes en una misma zona (zona 1) podrían tener diferentes frecuencias de muestreo en base al riesgo previamente determinado. Un ejemplo de esto se presenta en la Tabla 40.

Tabla 40. Frecuencias de muestreo sugeridas según el riesgo de contaminación.

PUNTOS DE MUESTREO DE ACUERDO A LA ZONA ESTABLE- CIDA		DIFICULTAD PARA LA LIMPIEZA		
		Baja	Media	Alta
	Zona 1	Frecuencia de muestreo MEDIA	Frecuencia de muestreo ALTA	Frecuencia de muestreo ALTA
Zonas 2 y 3	Frecuencia de muestreo BAJA	Frecuencia de muestreo MEDIA	Frecuencia de muestreo ALTA	
Zona 4	Frecuencia de muestreo BAJA	Frecuencia de muestreo BAJA	Frecuencia de muestreo MEDIA	

Color: nivel de riesgo

Es importante que los días de la semana y horarios destinados a realizar las actividades de muestreo sean al azar, rotándolos entre diferentes turnos (incluyendo fines de semana), de manera tal de reflejar las variaciones propias de la planta y verificar que la condición de inocuidad se mantiene en el tiempo. Por otra parte, no debe muestrearse el mismo lugar exacto dentro de una zona cada vez que se toman muestras, a menos que se demuestre que existe un lugar con un problema “crónico”. Se debe desarrollar un programa de rotación para permitir que todos los sitios de las zonas 1, 2, 3 y 4 queden cubiertos en el lapso de un determinado tiempo.

Es aconsejable que el momento de realizar el muestreo sea durante la producción (debe ser efectuado con un mínimo de 3-4 h de trabajo de las líneas de producción), ya que es probable que en esas condiciones los microorganismos que puedan estar colonizando algunos nichos en los equipos, se esparzan y puedan ser detectados. Sin embargo, si el muestreo se va a utilizar para verificar la eficacia del procedimiento de limpieza y desinfección, el muestreo debe llevarse a cabo después de cada ciclo y antes del inicio de la producción. Esto permitirá analizar la tendencia de los resultados e identificar problemas con anticipación. Si uno de los equipos utilizados para la producción es complejo o contiene zonas de difícil acceso, se recomienda tomar muestras mientras el mismo está en fun-

cionamiento, pero siempre antes de iniciar el procesamiento de los alimentos.

Cabe destacar que las muestras que se toman después de la aplicación de agentes desinfectantes deben incluir el uso de soluciones neutralizantes adecuadas para asegurar que el desinfectante residual no inhiba la recuperación de las células dañadas, si están presentes.

En cuanto a la cantidad de muestras que se deben tomar en el marco de un PMA, no existe un número predeterminado para cada zona de la planta, ya que el mismo dependerá del riesgo asociado. En líneas generales, el número de muestras a tomar dependerá de:

- Si el muestreo se realiza de forma rutinaria o con fines de investigación, luego de detectar una muestra positiva en un monitoreo anterior.
- El tamaño de la planta y el número de líneas de producción.
- La zona de la planta que se analizará (más cercana o lejana al área de producción).
- Si se siguen guías o normativas externas que definen un número mínimo de muestras.
- El presupuesto asignado al PMA.

El número de muestras a analizar (y la frecuencia de muestreo) debería incrementarse en las siguientes situaciones:

- La ocurrencia de un evento inusual o anormal (la detección de un patógeno en zona 1 o la obtención de un resultado fuera de especificación, sobre todo para el caso de los coliformes y *Enterobacteriaceae*).

- La introducción de nueva materia prima, la realización de actividades no rutinarias (tales como operaciones de refacción, mantenimiento o construcción de nuevas áreas).

#### - Requerimientos de cliente.

- En áreas que utilizan agua, las que tienen patrones de tráfico intenso, y donde se manipulan o almacenan las materias primas microbiológicamente sensibles deben ser muestreadas con un numero de muestras mayor.

En general, la mayoría de las muestras ambientales deben tomarse de las zonas 2 y 3 (40 y 30% del total respectivamente), mientras que de la zona 4 se deben tomar un número menor de muestras (10% del total). En este caso (zona 4), el centro de atención debe estar en los lugares que son adyacentes a las áreas de exposición del producto o en donde el tráfico (personas y materiales) fluye dentro y fuera de las áreas del producto expuesto. Los lugares alejados como vestidores, sitios de carga, depósitos, cafeterías y cuartos de descanso y otras áreas también deben incluirse. Se demostró que los casilleros de los empleados, si no se limpian y se les hace un mantenimiento en forma adecuada, son una fuente de contaminación de *Salmonella*.

La intención del muestreo de la zona 4 es identificar sitios potenciales de refugio de patógenos que pudieran, a la larga, llegar a ser una fuente para su propagación por toda la planta de producción. El plan de muestreo debe ser flexible, permitiendo la toma de muestras adicionales basadas en los datos obtenidos. Tanto la frecuencia como el número de muestras por zona son

parámetros que se pueden, y deben revisar y modificar, después de evaluar los resultados y la eficacia de las acciones correctivas. Nunca debe olvidarse que un PMA es dinámico y debe responder a los datos generados en el muestreo.

En términos generales, se sugiere tomar muestras con menor frecuencia en áreas lejanas a la zona de elaboración de alimentos, y gradualmente aumentar la frecuencia del muestreo a medida que el riesgo de contaminación sea mayor. En función de lo expuesto, se desprende que cada planta debe definir el número de muestras a analizar como así también la frecuencia del muestreo. En la Tabla 41 se muestra un ejemplo de un programa de monitoreo ambiental de *Salmonella* spp. (peligro identificado en la evaluación de riesgos), indicando el número mínimo de muestras que se deben colectar y la frecuencia del muestreo sugerida en las diferentes zonas de una planta alimenticia.

**Tabla 41.** Ejemplo de un programa de monitoreo ambiental de *Salmonella* spp., indicando número mínimo de muestras y frecuencia de muestreo sugeridas según zonificación de una planta alimenticia.

Zonificación	Análisis microbiológico	Número de muestras	Frecuencia de muestreo
Zona 1	Indicadores (CT, EB)	Según la línea	Diaria/ Semanal
Zona 2	Indicadores (CT, EB) <i>Salmonella</i> spp.	15-20	Semanal
Zona 3	Indicadores (CT, EB) <i>Salmonella</i> spp.	10-15	Semanal/ Mensual
Zona 4	<i>Salmonella</i> spp.	5-10	Mensual/ Bimensual

CT: Coliformes totales; EB: *Enterobacteriaceae*

#### Registro del muestreo

Las muestras colectadas deben ser

identificadas como mínimo con los datos que se indican a continuación:

- Código de la muestra
- Fecha y h del muestreo
- Nombre y apellido del responsable
- Descripción del sitio de la toma
- Condiciones de conservación
- Fecha de envió al laboratorio

Asimismo, puede incluirse también evidencia fotográfica de los sitios de muestreo donde se evidencien las condiciones de infraestructura, equipamiento, personal y cualquier otra condición que sea pertinente.

#### **4) TOMA DE MUESTRAS**

El éxito en la detección de microorganismos a nivel ambiental está relacionado con dos procesos esenciales: la toma de muestras y la metodología analítica empleada.

Como se mencionó en el capítulo V, algunos de los aspectos básicos a considerar para una correcta toma de muestras se indican a continuación:

- El personal.
- La planificación.
- Los materiales.
- La asepsia.
- Los procedimientos internos.

La humedad es uno de los factores más importantes para la supervivencia microbiana en las superficies. Por lo tanto, independientemente del dispositivo a utilizar, siempre es recomendable tomar muestras de una superficie humedecida o con un dispositivo de recolección humedecido para mejorar la recuperación. Una excepción a lo planteado resulta ser el muestreo de ambientes secos, donde la introducción de humedad es desaconsejable, ya que

aumenta el riesgo de crecimiento microbiano. En estos casos la toma de muestras, de materiales secos y polvo del medio ambiente, se suele llevar adelante mediante el empleo de dispositivos especiales (por ejemplo, espátulas, cucharas, utensilios).

El muestreo de bacterias patógenas (análisis cualitativos) se debe realizar con la intención de “querer encontrar al patógeno” para lo cual se es recomendable tomar muestras de la mayor superficie posible para mejorar la probabilidad de detección. En algunos casos, ciertas normativas o especificaciones de clientes pueden especificar el tamaño del área de muestreo. Para el caso de análisis cuantitativos (donde los resultados se expresan como UFC/cm<sup>2</sup>) generalmente se define un tamaño de área de muestreo específico. Las plantillas de muestreo pueden ayudar con la toma de muestras de un área definida, pero se debe tener precaución ya que su uso puede provocar una contaminación cruzada. Asimismo, tampoco sería raro, incluso para el muestreo cuantitativo, trabajar con un área de muestreo indefinida. Por ejemplo, en los análisis para recuento de bacterias aerobias mesófilas, cuyo valor de UFC se puede utilizar para evaluar la eficacia de la limpieza de áreas de difícil acceso, en cuyo caso puede resultar complicado tomar muestras de un área definida. En estos casos, los resultados pueden informarse en función del sitio de muestreo completo en lugar del área de superficie medida.

Asimismo, en algunas circunstancias se muestrean sitios puntuales (cuchillas, juntas, desagües, etc.) también con la imposibilidad de referirse a una superficie determinada, pero esto no afectara el resultado cuando se busca un microorganismo particular ya que el mismo se informa como presencia/ausencia.

Cuando se toman muestras ambientales, es de vital importancia que se utilice

una técnica aséptica adecuada de manera de prevenir posibles contaminaciones accidentales de la muestra. Para ello es recomendable un correcto lavado de manos antes de abrir el dispositivo de muestreo.

#### 4.1 Dispositivos de muestreo

A menos que esté definido por regulaciones específicas, la decisión principal que se debe tomar debe ser el tipo de dispositivo que se va a utilizar. Existe una gran diversidad de dispositivos de muestreo que pueden ser utilizados para la toma de muestras de superficies. Al momento de su selección deberán considerar aspectos tales como el tamaño del área a muestrear, la facilidad de acceso y el tipo de análisis que se le realizará a la muestra (cuantitativo o cuantitativo). En un PMA, es recomendable utilizar una combinación de dispositivos de muestreo diferentes, ya que no existe un método ideal que permita muestrear con eficiencia todas las superficies de una planta.

A continuación, se presenta una descripción de los principales dispositivos de muestreo comúnmente utilizados en la industria de los alimentos dentro de su PMA.

- **Hisopos.** Son adecuados para tomar muestras en lugares de difícil acceso y, generalmente, se usan para áreas de 100 cm<sup>2</sup>. Estos dispositivos pueden ser muy útiles para las pruebas ambientales cuantitativas (por ejemplo, para el recuento de microorganismos indicadores). El **hisopado de superficies** consiste en tomar una muestra de una superficie previamente delimitada (usualmente de 20 a 100 cm<sup>2</sup>) mediante el empleo de dispositivo delimitador (plancha de acero inoxidable u otro material). En caso de no ser desechable, es indispensable el delimitador sea esterilizado previo a su uso. Los hisopos deben retirarse, de manera aséptica, del envase contenedor prestando especial atención en no contaminar de manera accidental la

cabeza o cualquier otra parte del extensor. Posteriormente, se humedece la punta, ya sea con solución diluyente o neutralizante, retirando el exceso de líquido previo al hisopado (presionando la punta contra las paredes del recipiente con un movimiento de rotación). Luego de esto, el hisopo se inclina en un ángulo de 30° y se frota 4 veces sobre la superficie delimitada por la plantilla, cada una en dirección opuesta a la anterior. De inmediato, el mismo se coloca en el envase contenedor y se envía al laboratorio para su análisis.

- **Esponjas.** Estos dispositivos permiten muestrear superficies de mayor tamaño, en general mayores a 100 cm<sup>2</sup>, e incluso, en ocasiones, pueden esponjarse superficies del orden de 1 m<sup>2</sup> o una media res. En general suelen ser de celulosa o poliuretano, y pueden comercializarse en presentaciones con o sin mango de agarre, y secas y/o pre-hidratadas con alguna solución diluyente. Las esponjas deben retirarse de manera aséptica de su recipiente utilizando guantes o pinzas estériles, o manipulando el recipiente para acceder al mango del dispositivo. Se debe tener cuidado de no contaminar la esponja o cualquier otra parte del dispositivo que se volverá a introducir en el recipiente. En caso de esponjas secas, las mismas deben humedecerse previo a su uso. Para esto, primero se sumerge la esponja en una bolsa estéril con un volumen conocido de diluyente (en general 10 ml), posteriormente se escurre el excedente de líquido y se frota, vigorosamente, la superficie a muestrear en sentido vertical, luego horizontal, y luego en diagonal. Después de tomar muestras en una dirección, la esponja debe darse vuelta y frotar en una dirección perpendicular. Para el caso de superficies irregulares (cuchillas, equipos, utensilios) se debe frotar abarcando la mayor cantidad de superficie posible. Luego de esto, se coloca la esponja nuevamente en la bolsa con el diluyente y se masajea varias veces con el objetivo

de liberar los microorganismos contenidos en ella. El recipiente debe sellarse para ser transportado.

- **Placas de contacto o placas de RODAC** (por el inglés *Replicate Organism Direct Agar Contact*) permiten únicamente realizar recuentos de microorganismos en superficies planas, no porosas, y que tengan recuentos superiores a 100 UFC/cm<sup>2</sup>. Estas placas pueden contener medios de cultivo nutritivos (Por ejemplo, para realizar recuentos de bacterias aerobias totales) como medios de cultivo selectivos y/o diferenciales (para recuentos de grupos de microorganismos específicos). Al momento del muestreo, las placas son presionadas suavemente sobre la superficie a analizar, y luego son incubadas a la temperatura adecuada de crecimiento de los microorganismos buscados. Luego de esto, se procede al recuento de colonias, expresando los resultados se expresan como UFC/cm<sup>2</sup>. Estas placas suelen tener entre 55-60 mm de diámetro según el proveedor.

- **Paletas con agar.** Conocidos también como laminocultivos. Dispositivos similares a las placas de contacto la cual consiste en una lámina plástica a la que se adhiere en cada una de sus caras un medio de cultivo determinado (agar bacteriológico) que permite realizar el recuento de microorganismos. La lámina plástica se protege dentro de un tubo plástico transparente y se fija al tapón (de forma fija o flexible dependiendo de su aplicación) y permite su manipulación sin tocar el medio de cultivo con los dedos y evitar la contaminación. Generalmente tienen una superficie de alrededor de 7 a 10 cm<sup>2</sup> según el proveedor.

- **Enjuague.** Este método suele ser utilizado para el análisis de superficies vivas (como las manos de los manipuladores), para objetos pequeños, o para el muestreo de superficies interiores de envases, botellas, bolsas de plástico, entre otros. Depen-

diendo de la muestra, el método consiste en realizar un enjuague de la superficie o una inmersión (manos, objetos pequeños) en una solución diluyente la cual será posteriormente analizada.

#### 4.2 Diluyentes.

Generalmente, los diluyentes presentes en los hisopos o esponjas comerciales son los de uso mencionados en la norma ISO 6887-1, cuya composición se presenta a continuación:

##### A) Diluyente salino de peptona (agua de peptona tamponada 0,1%).

Peptona <sup>a</sup>	1,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8,5 g
Agua destilada	1000 ml

<sup>a</sup> Por ejemplo, digerido enzimático de caseína.

##### B) Agua de peptona bufferada de concentración normal (agua de peptona bufferada 1%).

Peptona <sup>a</sup>	10,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Hidrogeno fosfato disódico dodecahidratado (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •12H <sub>2</sub> O) <sup>b</sup>	9,0 g
Dihidrógeno fosfato potásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,5 g
Agua destilada	1000 ml

<sup>a</sup> Por ejemplo, digerido enzimático de caseína.

<sup>b</sup> Si se utiliza hidrogeno fosfato disódico con un contenido de agua diferente, se debe corregir proporcionalmente la masa de este ingrediente. Por ejemplo, en el caso de hidrogeno fosfato disódico anhidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), se utilizan 3,57 g.

##### C) Agua de peptona bufferada de concentración doble.

Se prepara disolviendo una cantidad

doble del medio comercial completo deshidratado en 1000 ml de agua. Si el mismo se prepara a partir de los ingredientes individuales, solamente se necesita añadir el doble de los dos ingredientes del buffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

#### D) Diluyente de buffer fosfato.

Hidrogeno fosfato disódico dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) <sup>a</sup>	9,0 g
Dihidrógeno fosfato potásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,5 g
Aqua destilada	1000 ml

<sup>a</sup> Si se utiliza hidrogeno fosfato disódico con un contenido de agua diferente, se debe corregir proporcionalmente la masa de este ingrediente. Por ejemplo, en el caso de hidrogeno fosfato disódico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), se utilizan 3,57 g.

#### 4.3 Agentes neutralizantes.

Durante los procesos de limpieza de la mayoría de las industrias alimenticias (incluyendo las procesadoras de carne y productos cárnicos), se utilizan productos químicos con el objetivo de inactivar los microorganismos presentes en el ambiente de procesamiento. Estos desinfectantes pueden seguir teniendo actividad bactericida y/o bacteriostática, incluso tiempo después del evento de muestreo, por lo que si sus residuos no son adecuadamente inactivados pueden interferir en los ensayos a realizar. Por ejemplo, pueden reducir la población microbiana dentro una muestra antes de que se realicen los análisis en el laboratorio, o directamente inhibir el crecimiento de un microorganismo determinado en los medios de cultivo normalmente utilizados para su búsqueda. En resumen, esto puede ocasionar conteos reducidos para métodos cuantitativos o resultados falso negativos para métodos cualitativos y, por lo tanto, no reflejando de manera fidedigna los potenciales riesgos presentes en el en-

torno de producción.

Para sortear este inconveniente, los dispositivos de recolección de muestras, como hisopos o esponjas, deben incorporar componentes que puedan neutralizar efectivamente cualquier desinfectante presente. Para seleccionar un neutralizante (o combinación de neutralizantes), debe conocerse qué tipos de desinfectantes se utilizaron en planta, ya que no todos son igualmente efectivos contra las diferentes clases de desinfectantes. Asimismo, es importante considerar que los neutralizantes a utilizar sean compatibles con las pruebas que se realizarán a continuación. La mayoría de los hisopos y esponjas disponibles en el comercio incluyen una combinación de soluciones neutralizantes como parte de las formulaciones estándar o patentadas. A continuación, se presentan los agentes neutralizantes comúnmente utilizados en los dispositivos de toma de muestras ambientales y su composición:

#### A) Caldo Letheen.

Digerido enzimático de tejido animal	10,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Polisorbato 80	5,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Lecitina	0,7 g

Este caldo posee capacidad neutralizante de desinfectantes con base yodo, compuestos de amonio cuaternario y cloro. Sin embargo, no neutraliza productos que contengan mercurio, formaldehído o glutaraldehído. Por otra parte, tiene propiedades de enriquecimiento, por lo que la superficie debería limpiarse después de la toma de muestra.

## B) Buffer neutralizante.

Complejo de sulfonato de arilo	5,0 g
Tiosulfato de sodio	0,16 g
Fosfato de potasio, monobásico	0,0425 g

Este buffer no neutraliza efectivamente los desinfectantes con fenol, mercurio, formaldehído o glutaraldehído (aunque actualmente son poco utilizado en la industria alimentaria debido a su toxicidad). Tiene la ventaja de no contener agentes de enriquecimiento, por lo que no es necesario volver a limpiar el sitio de muestreo después de la toma de muestra. Debido a que la formulación contiene complejo de aril sulfonato, es posible que, en ciertos casos, la muestra requiera de una etapa de dilución antes de realizar ensayos de base molecular.

## C) Buffer neutralizante D/E.

Digerido enzimático de caseína	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Polisorbato 80	5,0 g
Dextrosa	10,0 g
Lecitina	7,0 g
Tioglicolato de sodio	1,0 g
Tiosulfato de sodio	6,0 g
Bisulfito de sodio	2,5 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g

Este buffer fue desarrollado por Dey and Engley en 1970, para la neutralización y evaluación de agentes desinfectantes y antisépticos. Debido a que contiene un tinte indicador y posee capacidades de enriquecimiento, las superficies se deben volver a sanear después de recolectar una muestra.

## D) Agua peptonada bufferada.

No se recomienda su uso en superficies desinfectadas ya que tiene una capacidad neutralizante mínima. Por otra parte, tiene propiedades de enriquecimiento, por lo que la superficie debería limpiarse después de la toma de muestra.

La efectividad de los agentes neutralizantes contra los desinfectantes comúnmente utilizados en la industria de los alimentos puede variar. Un resumen de ello se presenta en la Tabla 42.

**Tabla 42.** Efectividad de los agentes neutralizantes contra desinfectantes de uso común en la industria de los alimentos.

Tipo de desinfectante	Agente neutralizante			
	Caldo Lethen	Buffer neutralizante	Buffer neutralizante D/E	Agua peptonada
<b>Compuestos cuaternarios de amonio</b>	SI	SI	SI	NO
<b>Fenoles</b>	SI	NO	SI	NO
<b>Yodo y cloro</b>	SI	SI	SI	NO
<b>Compuestos de mercurio</b>	NO	NO	SI	NO
<b>Formaldehído</b>	NO	NO	SI	NO
<b>Glutaraldehído</b>	NO	NO	SI	NO
<b>Ácido peroxiacético y peróxido de hidrógeno</b>	POCO	NO	SI	NO
<b>Ácidos</b>	SI	NO	SI	NO

#### **4.4 Almacenamiento y transporte de muestras.**

El almacenamiento y transporte de las muestras es el paso final en el proceso de muestreo ambiental debiendo poner especial atención en algunos aspectos. Si las muestras tomadas con hisopo, esponja o mediante enjuague se analizan en un laboratorio externo a la planta, los mismos deben transportarse refrigerados (4-8°C) a fin de asegurar la vida útil de la muestra hasta su llegada al laboratorio (según lineamientos descriptos en la norma ISO 18593). Los recipientes utilizados para el transporte deben estar limpios y desinfectados. Deben incluir material refrigerante y mantener una temperatura adecuada durante el transporte. El tiempo de transporte entre la toma de muestra y la recepción en el laboratorio estará en función tanto de dicha temperatura como del tipo de agente diluyente/neutralizante utilizado. Normalmente este tiempo no debe exceder las 24 h (exceptionalmente las 36 h). Sin embargo, existen dispositivos comerciales para la toma de muestras que emplean diluyentes que permiten el mantenimiento de viabilidad microbiana por 96 h.

No se debe permitir que las muestras se congelen en ninguna circunstancia, ya que esta condición puede afectar la viabilidad de los microorganismos presentes. Por su parte, las muestras tomadas con placas o paletas de contacto deben incubarse antes de transcurridas las 4 h.

#### **4.5 Métodos de análisis.**

Una vez recibidas las muestras en el laboratorio, se procederá con el análisis de estas mediante el empleo de métodos acordes a los objetivos perseguidos con el muestreo. Si se pretende aplicar métodos rápidos, la recomendación es que se elijan aquellos se cuenten con validaciones para las matrices de interés. En los capítulos VII y VIII se describen los diferentes métodos rápidos disponibles en el mercado tanto para análisis cuantitativos como cualitativos que se podrían aplicar para la búsqueda de microorganismos en el marco de un PMA. Para su selección se recomienda verificar que estén validados para muestras ambientales.

## 5) DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES MÁXIMOS PARA MICROORGANISMOS INDICADORES.

Ya sea que utilice el recuento de *Enterobacteriaceae* o de coliformes como método de indicadores cuantitativos, es muy importante determinar los valores de UFC de punto de partida que se esperaría encontrar en condiciones normales de operación y qué recuentos serían inaceptables. Esto implica trabajar para establecer los valores de punto de partida y los niveles de acción para los que se desvían del punto de partida. Una estrategia sería tomar muestras de diferentes puntos pertenecientes a una misma zona, intensivamente, durante un periodo de seis meses con el objetivo de establecer los niveles de punto de partida (muestreo preliminar de investigación) en UFC/cm<sup>2</sup>. Otra manera de establecer dichos valores sería aprovechar los datos históricos con los que cuenta la planta en relación con los recuentos de indicadores. Esto puede ayudar a comprender las tendencias y variaciones en los indicadores a lo largo del tiempo, lo que facilitará la determinación de valores límites.

Los valores límites pueden variar según el tipo de superficie y su función. Las superficies en contacto directo con alimentos (zona 1), como mesas de corte y equipos de procesamiento, deberían tener valores límites más bajos que las superficies de áreas no directamente relacionadas con la manipulación de alimentos (zona 3 y 4). En la tabla 43 se presenta, a modo de ejemplo, algunos valores límites de recuento de *Enterobacteriaceae* que podrían ser utilizados para diferentes zonas de una planta elaboradora de productos cárnicos.

Tabla 43: Valores límites sugeridos de recuento de *Enterobacteriaceae* (UFC/cm<sup>2</sup>) utilizados para diferentes zonas de una planta elaboradora de productos cárnicos.

Zonificación	Valores límites de <i>Enterobacteriaceae</i> (UFC/cm <sup>2</sup> )
Zona 1	1 a 10
Zona 2	1 a 10
Zona 3	10-50
Zona 4	50-500

Cabe destacar que cada planta es quien debe establecer tanto los valores de referencia como los valores inaceptables (Criterio Pasa/No Pasa) para cada zona de muestreo, en base ciertas características tales como el diseño y las características de la planta, el programa de limpieza y desinfección, especificaciones comerciales y/o decisiones de la planta entre otros.

Después del saneamiento, es de esperar niveles bajos de microorganismos indicadores en las superficies. Las mejoras en el proceso de limpieza y desinfección, la reparación de los equipos y los cambios en los procesos pueden permitir la aplicación de una nueva línea de referencia y de límites aceptables más bajos. Toda desviación significativa (por ejemplo, 1 log) por encima del nivel del punto de partida constituye una causa especial para una acción correctiva. Se deberá tener en cuenta variables como la estacionalidad, las diferencias geográficas, y cualquier otro factor que pueda afectar los valores de UFC/cm<sup>2</sup> del punto de partida. Los niveles de referencia determinados representan lo que un programa de limpieza y desinfección pueden ofrecer de forma consistente a través del proceso o de la planta y, por lo tanto, pueden utilizarse para exponer resultados que están fuera de especificación.

Los datos generados producto de un

PMA deben ser analizados de la forma más efectiva y dinámica posible. Para esto se puede realizar análisis de tendencias y la construcción de gráficas, entre otras. En este caso se debe elegir el método que más convenga y con el que el analista se sienta más cómodo. Es común que ciertas empresas generen muchos datos y a la hora de procesarlos para convertirlos en información valiosa para el sistema de gestión no sepan cómo interpretarlos. Es clave que dentro de las actividades establecidas se incluya esta actividad, donde lo ideal es no dejar pasar mucho tiempo, para que se puedan tomar acciones correctivas si este fuera el caso.

La Figura 46 representa un análisis de tendencias para el recuento de *Enterobacteriaceae* en diferentes puntos de la zona 1 y su valor de referencia establecido.

Recuento de *Enterobacteriaceae*



Figura 46. Análisis de tendencia para el recuento de *Enterobacteriaceae* (Log UFC/cm<sup>2</sup>) en diferentes puntos de zona 1 (puntos 1 a 18) y el valor de referencia establecido.

La Figura 47 presenta datos microbiológicos hipotéticos de análisis de tendencias de recuento de microorganismos indicadores en muestras ambientales en una planta elaboradora de alimentos. La línea horizontal continua representa un criterio microbiológico hipotético por encima del cual una muestra se considera sólo marginalmente aceptable. Un criterio basado en la presencia de más de un número específico de muestras marginales dentro de un período de tiempo específico sería la base

para determinar si un proceso está fuera de control y requiere acciones correctivas.

Del análisis de los datos se desprende que el sistema de calidad e inocuidad implementado se encuentra bajo control (a) (incluso con un sistema bien controlado, las desviaciones ocasionales ocurren), falta de control por exceso de variabilidad (b) (gran dispersión de valores que cumplen con el criterio de aceptación), pérdida de control debido a una variabilidad gradual (c) y súbita (d), y pérdida de control debido a fallas recurrentes (e).

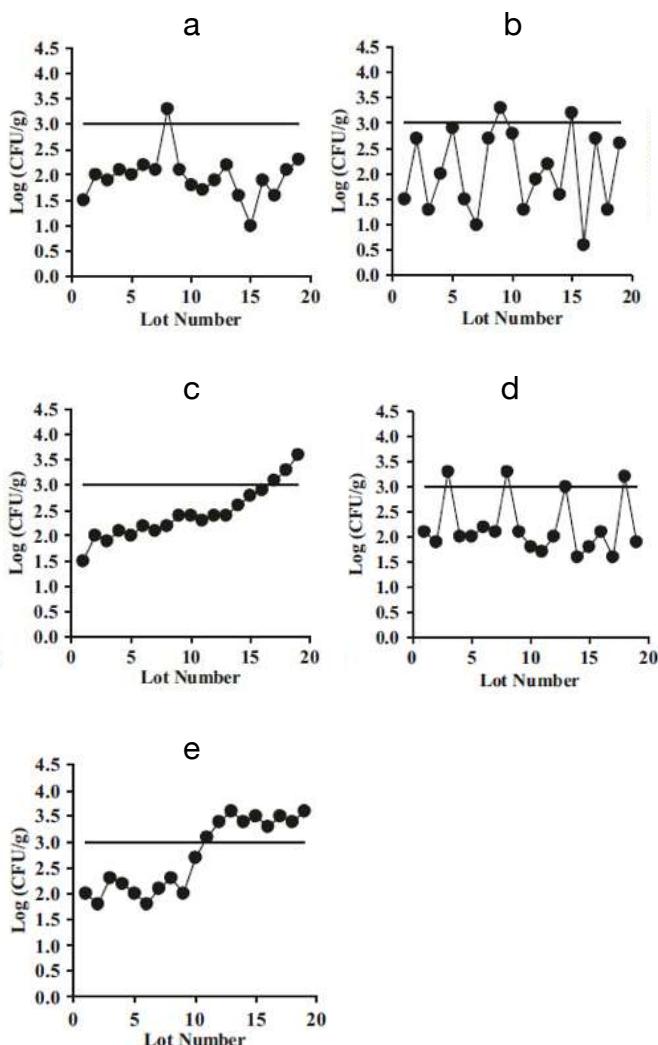


Figura 47. Análisis de tendencia para el recuento de microorganismos indicadores. Proceso bajo control (a), sin control (b), con una pérdida gradual (c) y súbita del control (d), y con una pérdida de control por fallas recurrentes (e).

Una tendencia al alza en los valores de indicadores, o una desviación repentina del punto de partida establecido, sería causa para iniciar una investigación y acciones correctivas. El equipo de respuesta debe evaluar cuidadosamente los datos de la tendencia con el paso del tiempo para establecer qué es lo que constituye una tendencia significativa.

El análisis de los datos debe realizarse periódicamente para identificar tendencias y problemas específicos que permitan introducir medidas correctivas adecuadas. Por ejemplo, el análisis frecuente puede ayudar a identificar una tendencia al aumento del número de microorganismos indicadores, lo que puede permitir que las plantas tomen medidas antes de que se produzca una falla mayor (presencia de un microrganismo patógeno). El análisis a más largo plazo también puede favorecer la comprensión de los efectos de la estacionalidad e identificar oportunidades de mejoras operacionales y de los productos.

## 6) ANÁLISIS DE HIGIENE Y DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS

Para minimizar el riesgo de contaminación cruzada de un alimento, la supervisión de la higiene del ambiente de procesamiento es un paso fundamental en las plantas alimenticias. Las industrias establecen POES, que consisten en un paso de limpieza seguido de otro paso de desinfección. La limpieza es el procedimiento que se realiza con el fin de eliminar la materia orgánica de una superficie, que puede actuar como fuente de nutrientes para los microorganismos. De esta manera, la eliminación de los residuos orgánicos reduce la oportunidad de que los microorganismos crezcan o se multipliquen, y a la vez, aumentando la eficacia de los desinfectantes que se aplican a continuación. Según las características del proceso productivo y/o del equipamiento, la limpieza puede ser

húmeda o seca. La desinfección, por su parte, es el procedimiento que se realiza con el fin de reducir a niveles admisibles la cantidad de microorganismos que sobreviven a la limpieza física.

El monitoreo ambiental debe establecerse de una manera holística el cual contempla el uso de diferentes elementos para asegurar tanto la inocuidad como la calidad alimentaria. En este sentido, el mismo debe incluir análisis que detecten residuos orgánicos y de alérgenos, como así también análisis que determinen los niveles de microorganismos indicadores y de deterioro y la presencia o no de patógenos (Figura 48).



Figura 48. Análisis de higiene y detección de microorganismos en superficies ambientales.

### Herramientas para el monitoreo de higiene

La evaluación de la efectividad de los POES se realiza en las industrias por métodos tradicionales de monitoreo microbiológico de superficie por recuento en placa. Aunque estos métodos son fiables y son considerados como *gold standard*, los tiempos de análisis los hacen imprácticos para una verificación de rutina, ya que requieren períodos de incubación que varían de 24 a 72 h. Otra desventaja de los métodos tradicionales es que no proveen información respecto a la presencia de re-

síndromes de alimentos en las superficies, que pudieran servir de nutrientes y permitir a los microorganismos dañados o estresados recuperarse y formar biofilms.

Por este motivo, se han desarrollado métodos alternativos, rápidos y sencillos, como lo son la detección de adenosín trifosfato (ATP) por bioluminiscencia y la detección de proteínas (alérgenos), a través de los cuales se obtienen resultados casi de inmediato, permitiendo adoptar de manera rápida acciones correctivas, en caso de ser necesario.

Sin embargo, estas pruebas rápidas no han sido desarrolladas para reemplazar las pruebas de microbiología tradicional, sino que son una herramienta complementaria que permite hacer eficientes los procesos de higiene, garantizando un monitoreo efectivo cuando se han implementado sistemas de calidad.

- El método de **detección de ATP por bioluminiscencia** consiste en evaluar la presencia de ATP en una superficie por medio de una reacción enzimática catalizada por la enzima luciferasa. Para esto, se toman muestras con un hisopo que contiene el reactivo de la enzima (luciferina). En presencia de ATP, una molécula energética presente en residuos biológicos, la enzima luciferasa cataliza la conversión de ATP en AMP, lo que genera una emisión de luz (Figura 48). La luz emitida como consecuencia de la reacción se detecta mediante un luminómetro y se expresa numéricamente en unidades relativas de luz (URL). El resultado de URL es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra. Así, una lectura alta de indica una gran cantidad de ATP en la muestra, lo cual a su vez representa una limpieza inadecuada y la presencia de posibles contaminantes de origen biológico. Mientras que una limpieza adecuada, se traduce en cantidades menores de ATP, y en consecuencia una

lectura de URL menor.

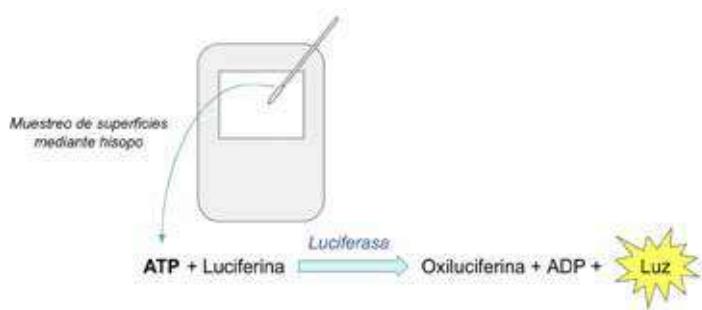


Figura 49. Determinación de los niveles de ATP en superficies mediante bioluminiscencia.

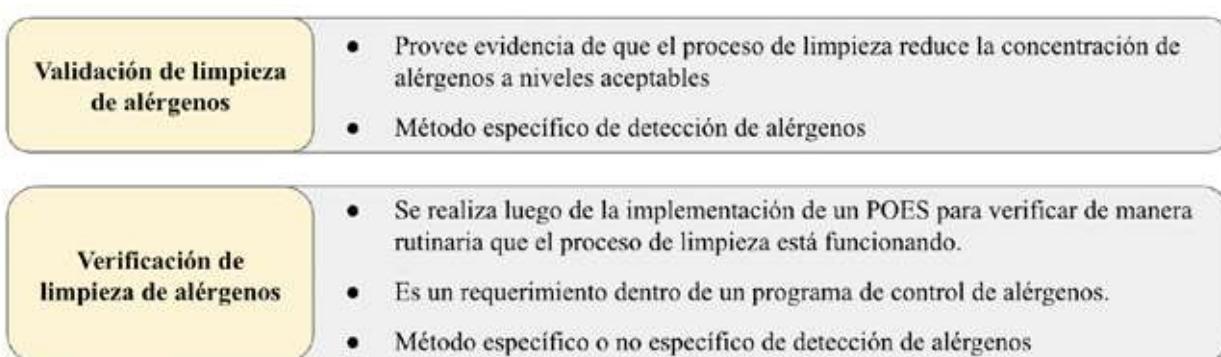
El equipo de luminiscencia utilizado permite clasificar los resultados obtenidos en tres categorías: Pasa, Alerta y Falla. La configuración de estas categorías es una parte fundamental de la ejecución de un programa exitoso de monitoreo de ATP. Los límites de URL pueden variar en función del tipo de producto fabricado, así como también de la superficie que está siendo analizada. Los equipos de luminiscencia generalmente proporcionan límites de URL recomendados, que cumplen las normas de higiene de la mayoría de los fabricantes. Sin embargo, cada planta procesadora de alimentos debe establecer las especificaciones técnicas para limitar los riesgos.

En caso de un resultado de ATP de Alerta o Falla, deben implementarse acciones correctivas de manera inmediata.

- Los **métodos de detección de residuos de proteínas** permiten detectar la presencia de alérgenos en alimentos. Numerosos alimentos, tales como la leche, huevos, pescado, frutos del mar, legumbres, frutos secos y cereales, entre otros, pueden causar reacciones alérgicas. Cerca del 1% de la población mundial es alérgica a componentes (generalmente proteínas) encontrados en alimentos. Las reacciones alérgicas varían en función de la sensibilidad de cada persona. Algunas reacciones pueden ser moderadas, tales como lagrimeo, rinitis y cefalea, pero en ocasiones, pueden llevar

a la ocurrencia de shock anafiláctico grave en individuos extremadamente sensibles. Las industrias alimentarias que trabajan con alérgenos conocen la importancia de tener implementados protocolos de limpieza capaces de evitar cualquier riesgo de contaminación cruzada de alérgenos entre diferentes productos elaborados en las mismas líneas de producción, como así también alertar sobre la presencia de alérgenos en los alimentos producidos mediante el etiquetado correspondiente.

Los protocolos de limpieza y desinfección, aunque pueden ser eficientes desde un punto de vista higiénico, pueden ser ineficaces para la eliminación de alérgenos. Por este motivo, resulta necesario diseñar un correcto protocolo de limpieza de alérgenos, el cual debe ser validado y luego verificado de manera rutinaria para determinar la presencia o no de los alérgenos en las líneas de producción (Figura 50).



**Figura 50.** Validación y verificación de limpieza de alérgenos alimentarios.

Para la etapa de validación, se deben utilizar métodos analíticos específicos, que aportan información directa sobre proteínas específicas de los alérgenos. Los métodos específicos más comunes son los inmunológicos, como el enzimoinmunoensayo (ELISA). Estos métodos permiten detectar y cuantificar los alérgenos en las líneas de producción antes y después de la aplicación de los POES, y así determinar si el protocolo de limpieza diseñado es capaz de eliminar los alérgenos hasta niveles aceptables de seguridad. Tras validar el proceso de limpieza, este tiene que ser verificado. El proceso de verificación tiene como objetivo demostrar que cada vez que se emplea el proceso de limpieza, éste funciona correctamente y es capaz de eliminar los alérgenos. Para este paso es posible emplear métodos específicos o métodos no específicos, los cuales aportan información indirecta del riesgo, tales como las tiras rápidas que permiten determinar la presencia o no del alérgeno en función del umbral de seguridad.

Los métodos de detección de residuos de proteínas a través de las tiras rápidas son muy sencillos de realizar por personas sin conocimientos técnicos y permiten obtener resultados de manera inmediata.

## 7. ANÁLISIS DE AIRE

El aire se considera una fuente de contaminación al ser un vehículo muy propicio para el arrastre de partículas físicas, químicas y/o biológicas que pueden causar problemas. Para su evaluación, existen diferentes métodos. Uno de los más utilizados es el método de sedimentación en placas de agar (método pasivo), el cual consiste en exponer al ambiente, en diferentes puntos de la planta, placas de Petri con medio de cultivo sólido durante un tiempo determinado con el objetivo de que los microrganismos presentes en el aire sedimenten en el medio de cultivo por acción de la gravedad. El tiempo de exposición depende del ambiente a evaluar, mientras mayor sea la contaminación menor será el tiempo. El “Standard methods

*for the examination of Dairy Products*", recomienda como tiempo de exposición 15 min. Transcurrido el mismo, las placas se incuban en estufa para luego realizar el recuento de las colonias obtenidas (UFC/min o UFC/placa). Con este método se detectan los microorganismos con potencialidad para caer sobre la superficie de la placa, lo cual simula una contaminación de producto expuesto en una línea de producción.

Dentro de las ventajas del método podemos mencionar la facilidad de implementación y el costo. Como desventajas se mencionan una incapacidad para medir el número de microorganismos por volumen de aire (lo cual conlleva una dificultad a la hora de comparar y estandarizar resultados) y la existencia de múltiples factores que pueden alterar la sedimentación de los microorganismos (corrientes de aire), afectando por tanto a los resultados, y a la posibilidad de comparar distintas series analíticas debido a la variabilidad de los resultados obtenidos. En muchos casos este método debería ser considerado como de "análisis general" de la calidad de aire, pero no para comparar resultados entre diferentes áreas de la planta ya que no es estandarizable.

Otro de los métodos comúnmente utilizados para medir la contaminación del aire es el de impactación (método activo), el cual implica la recolección de microorganismos mediante el empleo de un dispositivo conocido como impactador. El mismo produce un flujo de aire el cual es dirigido sobre el medio de cultivo, de tal manera que las partículas del aire impacten y queden retenidos en placas o tiras con medio de cultivo sólido o semisólido, y/o medio de cultivo líquido. Existen diversos tipos de impactadores (multiorificio, en cascada, de rendija, y trampa de esporas entre otros) los cuales varían en características tales como el caudal de muestreo, la distancia entre la entrada de aire y la superficie de impactación, el número de orificios, la longitud de

los orificios de entrada de aire, etc.

La impactación en placa de Petri con agar presenta la ventaja de que los microorganismos pueden ser captados directamente en el medio de cultivo para su subsiguiente incubación y conteo de colonias que se han formado sin necesidad de un procesamiento posterior al muestreo. Asimismo, tiene la posibilidad de medir el volumen de litros de aire recolectados con lo cual se puede informar la concentración microbiana en UFC/cm<sup>3</sup>. Se debe recordar que no existen normativas para calidad de aire en la industria de los alimentos (como si los hay para la industria farmacéutica y cosmética) sino que cada planta debe establecer sus valores límites.

### Calidad de aire comprimido

Siempre que el aire comprimido entre en contacto con los alimentos, es preciso extremar la precaución, ya que el mismo no es puro por naturaleza. Al enfriarse, el aire comprimido se condensa en forma de humedad. Por lo tanto, para evitar la contaminación del alimento es importante disponer de aire comprimido de la calidad apropiada en cada caso. Por ejemplo, en la norma ISO 8573-1 se mencionan requisitos de calidad para aire comprimido y determina qué cantidad máxima de contaminantes y tamaños de partículas puede contener cada clase correspondiente. En este sentido, las normas definen estándares lo que permite que puedan ser utilizados a nivel mundial. La contaminación del aire comprimido por microorganismos, aceites, humedad o partículas puede trasladarse al producto final y provocar una enorme pérdida de calidad. Es recomendable incluir el control de la calidad de aire comprimido dentro de los sistemas de programas de monitoreo de contaminantes en una planta elaboradora de alimentos.

## 8. ACCIONES CORRECTIVAS FRENTE A DESVIOS EN LOS RESULTADOS

A través de la implementación de un

PMA en una industria alimenticia, se obtienen numerosos datos, los cuales deben ser analizados de manera holística generando conocimiento que permita tomar acciones. El aumento de microorganismos indicadores, de deterioro y/o la presencia de patógenos permite identificar puntos de desvío en las condiciones sanitarias, los cuales deben desencadenar en una investigación y análisis de causa raíz, como así también en la implementación de acciones correctivas apropiadas, de manera tal de retomar los valores de base o incluso mejorarlos.

Si se obtiene un resultado positivo para microorganismos patógenos identificados como peligros en cualquiera de las zonas de muestreo, el área se debe examinar a fondo visualmente y a través de hisopado de vectores con el objetivo de determinar la extensión de la contaminación y poder establecer las causas potenciales del problema. El hisopado de vectores implica tomar múltiples muestras ambientales adicionales en torno al lugar en donde se encuentre el resultado positivo. Este muestreo generalmente se hace en un patrón típico “estelar” o “de 360°” alrededor del sitio positivo inicial como se muestra. Habitualmente, se toman de 10 a 15 muestras adicionales con esponja o hisopo alrededor de los lugares positivos iniciales. El muestreo debe irra-

diarse a partir del lugar positivo inicial hacia todas las direcciones, incluyendo hacia arriba y hacia abajo, si corresponde.

Las acciones correctivas específicas tomadas deben estar basadas en una evaluación de la posibilidad de contaminación de un producto terminado y en la ubicación del lugar positivo inicial. En este sentido, no debería tener el mismo impacto un hallazgo de *Salmonella* o de *L. monocytogenes* en una muestra perteneciente a la zona 1 que en muestras de zonas 2, 3 y 4 ya que en este caso no necesariamente se involucra al producto terminado, con lo cual la decisión que se tome debe ser consensuada por el equipo de gestión correspondiente.

Dado que las razones que llevan a obtener un resultado positivo de microorganismos patógenos en el ambiente son probablemente específicas de cada planta en particular, la medida de acción correctiva diferirá de planta a planta en base a los productos alimenticios finales.

De manera general, todo plan de acción de la planta debe describir acciones correctivas a corto y a largo plazo, y deben ser específicas para cada una de las cuatro zonas (Figura 51).

#### Acciones correctivas a corto plazo

- Restringir el acceso al área.
- Interrumpir las funciones e inspeccionar el área y los equipos.
- Tomar muestras con hisopos de vectores del sitio que arrojó resultado positivo.
- Realizar un muestreo preoperacional. No reiniciar las operaciones hasta que todas las muestras den resultados negativos.
- Aumentar la frecuencia de muestreo. Reanudar frecuencia previa luego de tres días consecutivos de resultados negativos.

#### Acciones correctivas a largo plazo

- Eliminar nichos en áreas potenciales.
- Eliminar fuentes y acumulación de agua.
- Reparar daños en la estructura.
- Revisar las BPM.
- Actualizar/revisar los procedimientos de limpieza y desinfección.
- Realizar auditorias de las prácticas de producción y mantenimiento.
- Reforzar las prácticas de higiene personal y reforzar capacitaciones.

**Figura 51.** Acciones correctivas a corto y largo plazo ante la detección de un microorganismo patógeno en el ambiente.

Algunas posibles acciones correctivas son:

- Interrumpir las funciones e inspeccionar los equipos.
- Limpiar y desinfectar a fondo todos los equipos, superficies y herramientas del área.
- Cambiar los productos químicos de limpieza utilizados como desinfectantes.
- Modificar las frecuencias y tiempos de desinfección.
- Capacitar al personal o realizar supervisión adicional.

Si luego de la implementación de las acciones correctivas continúa detectándose el agente patógeno en el ambiente, puede ser indicio de que el mismo se instaló en la planta (cepa residente) y se está multiplicando. Por lo tanto, es de vital importancia llevar adelante acciones correctivas más agresivas para erradicar el microorganismo. En una situación rara y extrema, donde la zona problema no puede ser eliminada, el área debe aislarse físicamente del resto de la planta, en cuarentena, hasta que se pueda encontrar una solución definitiva.

A continuación, se presentan algunos ejemplos de acciones correctivas que se podrían implementar como producto de un desvío en el análisis de microorganismos indicadores (Por ejemplo: *Enterobacteriaceae* o *Listeria* spp.) en diferentes zonas de una planta elaboradora de alimentos.

### Zona 1

- Retener el producto elaborado si se va a realizar un análisis de *Salmonella* spp. o *L. monocytogenes* en la zona.
- Aislar la zona sospechosa y restringir acceso.
- Desarmar la línea y realizar muestreo de vectores adicionales alrededor del resultado positivo antes de la limpieza.

- Desarmar la línea y realizar muestreo de vectores adicionales (zonas 2, 3) antes de la limpieza.
- Limpiar y desinfectar a fondo la línea.
- Realizar inspecciones preoperativas en los equipos de la línea.
- Muestrear vectores adicionales antes de poner en marcha la línea. Poner producto en espera hasta obtener los resultados.
- Aumentar la frecuencia de muestreo de la línea (zonas 1, 2 y 3) de semanal a diario.
- Reanudar el plan de muestreo de rutina normal del PMA luego de 3 días consecutivos de resultados negativos.
- Tomar decisiones sobre la disposición del producto terminado como resultado de un hallazgo positivo de *Salmonella* spp. o *L. monocytogenes* en la zona 1.
- Tener en cuenta que hacer pruebas de lotes de productos terminados en busca de los patógenos en respuesta a un resultado confirmado de la zona 1 con el objetivo de lanzar el producto al mercado no es una práctica recomendable.

### Zona 2

- Detener la producción y realizar limpieza y desinfección.
- Aislar la zona sospechosa y restringir acceso.
- Desarmar la línea y realizar muestreo de vectores adicionales alrededor del resultado positivo antes de la limpieza.
- Desarmar la línea y realizar muestreo de vectores adicionales (zonas 1, 2, 3) antes de la limpieza.
- Limpiar y desinfectar a fondo la línea.
- Realizar inspecciones pre-operativas en los equipos de la línea.
- Muestrear vectores adicionales antes de poner en marcha la línea.
- Aumentar la frecuencia de muestreo de la línea (zonas 2 y 3) de semanal a diario.

- Reanudar el plan de muestreo de rutina normal del PMA luego de 3 días consecutivos de resultados negativos.

### Zona 3

- Decidir si se detiene o no producción (basado en la proximidad del sitio positivo).
- Evaluar aislar zona y restringir acceso (recomendable).
- Realizar muestreo de vectores adicionales (zonas 2, 3 y 4) antes de la limpieza.
- Limpiar y desinfectar a fondo la línea.
- Realizar inspecciones pre-operativas en los equipos de la línea.
- Tomar muestras antes de poner en marcha la línea.
- Aumentar la frecuencia de muestreo de la línea (zonas 2 y 3) de semanal/mensual a diario.
- Reanudar el plan de muestreo de rutina normal del PMA luego de 3 días consecutivos de resultados negativos.

### Zona 4

- Evaluar el impacto del resultado. Si bien un resultado positivo no implica al producto terminado, brinda información vinculada con el potencial de propagación del patógeno por la planta.
- Evaluar aislar zona y restringir acceso (recomendable).
- Realizar muestreo de vectores adicionales (zonas 3 y 4) antes de la limpieza.
- Limpiar y desinfectar a fondo el sitio.
- Tomar muestras del área y de vectores adicionales del área después de limpiar y desinfectar para verificar eficacia.
- Aumente la frecuencia de muestreo de la línea (zonas 3 y 4) de mensual/bimensual a diaria.
- Reanudar el plan de muestreo de rutina normal del PMA luego de 3 días consecutivos de resultados negativos.

No sería sorprendente encontrar ocasionalmente un resultado positivo de *Salmonella* spp. o *L. monocytogenes* en zona 4. Dicho hallazgo se debe tratar agresivamente con el fin de minimizar el potencial de propagación del patógeno a otras partes de la planta. Asimismo, un resultado positivo en algún sitio de la zona 3, ante la ausencia de un positivo en la zona 2, podría deberse a problemas de flujo del tráfico, problemas estructurales o de mantenimiento entre otros.

El hallazgo de áreas con problemas o “zonas calientes” en la planta, repetidos y persistentes en el tiempo, podría ser un indicio de la presencia de “nichos” en donde el patógeno se estableció y se puede estar multiplicando. En este caso, se deben tomar acciones correctivas agresivas con el objetivo de contener y corregir el problema. Frente a este escenario es recomendable que el equipo de gestión tome las siguientes medidas como parte de un análisis de causa raíz:

- Realizar un diagrama de la planta y ubicar los sitios positivos para ayudar a definir el alcance del problema.
- Implementar muestreos diarios de vectores hasta que se corrija la situación.
- Restringir el flujo de tráfico en estas áreas lo más posible.
- Inspeccionar visualmente las áreas en busca de nichos potenciales e intensificar los esfuerzos de limpieza de estas áreas.
- Reforzar las prácticas de seguridad alimentaria y BPM con los operadores de línea y demás personal.
- Examinar las prácticas de limpieza de equipos y de mantenimiento preventivo; realizando modificaciones según sea necesario.
- Reparar daños estructurales (Por ejemplo, pisos, paredes, otras estructuras) según sea necesario.
- Rediseñar o realizar mantenimiento a los equipos según sea necesario.



# **CAPÍTULO X**

## **GUÍA PARA ANÁLISIS PARA CALIDAD DE AGUA POTABLE**

*Julián Paolini<sup>1</sup> y Carlos Alli<sup>2</sup>*

1. Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI),  
Villa Regina, Río Negro, Argentina.
2. Coordinación de Activos y Residuos Químicos, Dirección General  
de Laboratorios y Control Técnico, Servicio Nacional de Sanidad y  
Calidad Agroalimentaria (Senasa), Martínez, Buenos Aires, Argentina.

## **Programa de calidad del agua (Circular Senasa 4247/2016)**

El agua que es utilizada en los establecimientos elaboradores de productos alimenticios debe ser potable (apta para consumo humano). En el Código Alimentario Argentino (Capítulo XII, Art 982) y en el Reglamento del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria -Decreto 4238/68- (Capítulo IV, Inciso 4.3.2) se establecen las características fisicoquímicas, organolépticas y microbiológicas para asegurar la condición de potable. Además, los establecimientos exportadores deben cumplir con los requisitos exigidos por los países de destino. En el anexo 5 se presentan los requisitos según los principales destinos de carne bovina.

El programa para el control de inocuidad del agua potable empleada en las plantas frigoríficas es exclusiva responsabilidad de la empresa. La verificación de su cumplimiento es responsabilidad del Servicio de Inspección Veterinaria (SIV) en planta.

La empresa debe contar con un procedimiento operativo estandarizado (POE), en el cual se detalla la toma de muestra con su frecuencia, el plano de grifos numerados, el procedimiento de clorinación y el modelo de planillas de registro. La empresa debe realizar un monitoreo de control del proceso de clorinación y el SIV debe verificar el cloro libre pudiendo utilizar como primer control el realizado por la empresa.

En la Circular Senasa 4247/2016 se detallan los equipos de medición de cloro libre y clorinación; como así también el diagrama de grifos, fuentes de agua y muestras oficiales.

### **Análisis microbiológicos y fisicoquímicos**

Los análisis microbiológicos y fisicoquímicos oficiales deben ser realizados por laboratorios autorizados por Senasa (Ver capítulo II de este manual), los cuales

preferentemente deben contar con acreditaciones para los análisis a realizar. Para poder verificar si el laboratorio cuenta con estas acreditaciones se puede solicitar el certificado de acreditación al mismo laboratorio, o bien verificar la web del Organismo Argentino de Acreditación (OAA <https://oaa.org.ar/entidades-acreditadas/>) o de la institución donde se haya realizado el proceso de acreditación: Organismo Uruguayo de Acreditación (<https://www.organismouruguayodeacreditacion.org/laboratorios-de-ensayo-le/>), Entidad Nacional de Acreditación-España (<https://www.enac.es/entidades-acreditadas/busador-de-acreditados>), International Accreditation Service-IAS USA (<https://www.iasonline.org/>), entre otras. Sin embargo, y de acuerdo con la Circular Senasa 4247/2016, los establecimientos que produzcan productos exclusivamente para consumo interno podrán analizar sus muestras en laboratorios de universidades y otros organismos públicos.

### **Análisis de sustancias inorgánicas y contaminantes orgánicos**

Actualmente, no existe una directiva específica para los análisis de sustancias inorgánicas y contaminantes orgánicos para establecimientos de faena bovina y porcina. Hasta el año 2020, las determinaciones se realizaban según la oferta del Instituto Nacional del Agua (INA). En el año 2022, el Senasa abrió la inscripción de laboratorios en la RedLab para el análisis de rubros analíticos y se está trabajando una nueva Circular que incluye estos compuestos químicos.

Considerando que aún no todos los rubros analíticos que se abrieron para la inscripción a la RedLab poseen laboratorios autorizados por el Senasa para realizar estos análisis, se recomienda optar por aquellos que demuestren calidad en los resultados, como estar acreditados bajo norma ISO 17025 la mayor cantidad posible

de parámetros o laboratorios de la RedLab autorizados en rubros similares en otras matrices.

A continuación, se presenta una serie de tablas con distintos tipos de análisis (microbiológicos y fisicoquímicos) y sus

valores máximos permitidos según lo establecido en el Código Alimentario Argentino (CAA) y la Unión Europea (UE). De ser necesario que una muestra cuente con análisis bajo las 2 normativas, deberá cumplir con la más restrictiva en cada parámetro.

**Tabla 44.** Análisis microbiológicos para agua potable según CAA y UE.

Análisis Microbiológicos	CAA <sup>(*)</sup>	Directiva UE
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos a 22°C (ISO 6222)	menor a 500 UFC/ml	menor a 100 UFC/ml
Recuento de bacterias coliformes (ISO 9308-1)	Ausencia en 100 ml	Ausencia en 100 ml
Recuento de <i>Escherichia coli</i> (ISO 9308-1)	Ausencia en 100 ml	Ausencia en 100 ml
Recuento de <i>Clostridium perfringens</i> incluidas sus esporas (ISO 14189)	-	Ausencia en 100 ml
Recuento de Enterococos (ISO 7899-2)	-	Ausencia en 100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ISO 16266)	Ausencia en 100 ml	-

(\*) Revisar en el CAA, otras opciones de metodologías permitidas, además de las mencionadas en la presente tabla.

**Tabla 45.** Análisis microbiológicos para agua potable según CAA y UE.

Análisis Fisicoquímicos	CAA Cap XII (mg/l)	UE 2184/2020 (mg/l)
Color	Max 5 escala Pt-Co	Aceptable para los consumidores y sin cambios anómalos
Olor	Sin olores extraños	Aceptable para los consumidores y sin cambios anómalos
Turbiedad	Max 3 NTU	Aceptable para los consumidores y sin cambios anómalos
pH	6,5-8,5	6,5-9,5
Residuo fijo (mg/l)	Max 1500	-
Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	-	Max 2500
Dureza Total ( $\text{CO}_3\text{Ca}$ ) (mg/l)	Max 400	-
Bromato (mg/l)	Max 0,01	Max 0,01
Cianuro (mg/l)	Max 0,10	Max 0,05
Fluoruro (mg/l)	Según temperatura de la zona de toma de muestras	Max 1,5

<b>Análisis Fisicoquímicos</b>	<b>CAA Cap XII (mg/l)</b>	<b>UE 2184/2020 (mg/l)</b>
Cloruros (mg/l) expresado como Cl-	Max 350	Max 250
Sulfatos (mg/l) expresado como SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	Max 400	Max 250
Nitratos (mg/l) expresado como NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Max 45	Max 50
Nitritos (mg/l) expresado como NO <sup>2-</sup>	Max 0,10	Max 0,50
Amoníaco (mg/l) expresado como NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Max 0,20	Max 0,50
Cloro activo residual (mg/l)	Min 0,20	-
Oxidabilidad (mg O <sub>2</sub> /l)	-	Max 5

En el anexo 5 se comparan los parámetros para contaminantes químicos. Además, se incluyeron parámetros que no figuran en la Circular Senasa 4247/2016, aunque son parte de las normativas de China, UE y CAA. En este anexo, los plaguicidas que figuran en la columna de UE son a modo de ejemplo, ya que en la normativa se incluyen familias de plaguicidas sin especificar compuestos en particular.

En el Senasa ya se establecieron los grupos con las sustancias que se deben incluir y sus respectivos parámetros, los cuales serán solicitados en muestras de agua según CAA y UE. Si bien no se incluyen todos los que figuran en la normativa UE, fueron considerados los de mayor relevancia o riesgo.

## FRECUENCIAS DE MUESTREO

### Análisis microbiológico

Tabla 46. Frecuencia de muestreo de agua para análisis microbiológicos según tipo de establecimiento y fuente de aprovisionamiento (Circular Senasa 4247/2016, Anexo II).

<b>Tipo de establecimiento</b>	<b>Frecuencia de muestreo según fuente de aprovisionamiento</b>		
	<b>Laguna, río o vertiente</b>	<b>Agua de pozo</b>	<b>Agua de red</b>
Plantas de faena, plantas de procesamiento de animales de caza. Establecimientos no incluidos en otras frecuencias (ej.: despostada, fábrica de chacinados y afines, triperías)	QUINCENAL	MENSUAL	
Establecimientos elaboradores de gelatinas, plasma sanguíneo comestible, margarinas, graserías, elaboradores de ovoproductos.		BIMESTRAL	
Elaboradores de subproductos de origen animal destinados a consumo animal y opoterápico.		TRIMESTRAL	
Establecimientos dadores de frío, depósitos sin actividad de frío, depósitos de productos comestibles y depósitos subproductos de origen animal destinados a consumo animal, acopio y clasificación de huevos, curtiembres.		SEMESTRAL	

## Análisis fisicoquímico

**Tabla 47.** Frecuencia de muestreo de agua para análisis fisico-químicos según tipo de establecimiento y fuente de aprovisionamiento (Circular Senasa 4247/2016, Anexo II).

<b>Tipo de establecimiento</b>	<b>Agua de pozo (Semestral)</b>
Plantas de faena, plantas de procesamiento de animales de caza. Establecimientos no incluidos en otras frecuencias (ej.: despostada, fábrica de chacinados y afines, triperías)	
Establecimientos elaboradores de gelatinas, plasma sanguíneo comestible, margarinas, graserías, elaboradores de ovoproductos.	En cada pozo, sin excepción, independientemente de la cantidad de pozos que tenga el establecimiento, o sea, una muestra cada seis meses hasta completar la totalidad de los pozos.
Elaboradores de subproductos de origen animal destinados a consumo animal y opoterápico.	
Establecimientos dadores de frío, depósitos sin actividad de frío, depósitos de productos comestibles y depósitos subproductos de origen animal destinados a consumo animal, acopio y clasificación de huevos, curtiembres.	

Cuando los valores de los resultados obtenidos sean constantes y significativamente menores a los límites establecidos durante al menos 2 (dos) años sucesivos, podrá reducirse la frecuencia a una muestra anual. En caso de tener algún parámetro alterado se volverá a la frecuencia inicial semestral.

## Análisis de sustancias inorgánicas y contaminantes orgánicos

Pueden considerarse a modo de referencia las siguientes frecuencias de muestreo hasta tanto queden definidas en directiva específica que actualice la Circular Senasa 4247/2016.

**Tabla 48.** Análisis de sustancias inorgánicas y contaminantes orgánicos en agua (Circular Senasa 4247/2016).

<b>Tipo de análisis</b>	<b>Frecuencia</b>
Sustancias inorgánicas	Semestral. Para Hierro y Aluminio en caso de que se utilice para el tratamiento del agua, la frecuencia se recomienda mensual.
Contaminantes orgánicos	Anual.

## TOMA DE MUESTRAS (Circular 4247 /2016)

**Materiales para la toma de muestras:** serán entregados por las empresas listos para usar (estériles de ser necesario, con tiosulfato en caso de tratarse de agua clorinada y debidamente rotulado “POSEE TIOSULFATO DE SODIO”).

### Extracción de la muestra:

- Cepillar (rasquetear) el pico de la canilla externa e internamente para eliminar completamente los detritos depositados.
- Abrir completamente la canilla y dejar correr el agua durante 1 min.
- Cerrar la canilla y calentar con soplete o con hisopo de algodón embebido en alco-

- hol hasta evaporación total del agua.
- d. Abrir nuevamente la canilla dejando correr el agua durante 1 min y cuidadosamente acercar la boca del frasco, quitar la tapa y permitir el ingreso del agua hasta su llenado.
- e. Tapar cuidadosamente y dejar una pequeña cantidad de aire en el interior del frasco.
- f. Rotular consignando lugar, hora y temperatura ambiente.
- g. Colocar en un recipiente refrigerado.
- h. Precintar o lacrar el envase conteniendo el agua.
- i. Confeccionar el acta (PG7), la cual será firmada por el responsable de la toma de muestra (control de calidad de la empresa) y un representante oficial del SIV.
- j. Identificar las muestras para análisis microbiológico y fisicoquímico con el número de acta que corresponda y la fecha de toma de muestra.
- k. Remitir al laboratorio.

#### **Recomendaciones:**

- 1) Para análisis microbiológicos tomar la muestra en un envase estéril. Este envase solo se utilizará para análisis microbiológico. Si el agua posee cloro, adicionar tiosulfato de sodio. Se necesitan 7 mg para inactivar 1 mg de cloro. Tener la precaución de no llenar el envase con el agua a analizar hasta el tope.
- 2) Si en las muestras se van a analizar parámetros “contaminantes”, se debe tener en cuenta lo siguiente:

a- Para análisis de sustancias inorgánicas: tomar la muestra en envase plástico. Si la muestra es refrigerada inmediatamente y la misma llega al laboratorio en condiciones de refrigeración dentro de las 24 h de tomada la muestra no es necesario agregar conservante, si no

pudiera llegar al laboratorio en el lapso de 24 h se debe acidificar con ácido nítrico hasta un pH menor a 2.

b- Para análisis de contaminantes orgánicos halometanos, haloetenos, haloletanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos, halobencenos y fenoles: tomar como mínimo 1 envase de 1 litro de vidrio color caramelo y un vial de 40 ml color caramelo con tapa con septum de teflón. La muestra en el vial se utiliza para el análisis de contaminantes que son volátiles, dado que el septum le confiere un cierre hermético a la tapa, evitando que se pierdan componentes volátiles si estuvieran presentes.

c- Para análisis de contaminantes orgánicos-pesticidas: tomar como mínimo 1 litro en envase color caramelo.

#### **Criterios de acción ante la presencia de algún parámetro alterado (Circular 4247/2016)**

Ante la detección de algún parámetro fuera de los límites establecidos, se implementarán medidas correctivas y acciones preventivas dentro de las 72 h posteriores a la notificación. Si el desvío representa un riesgo para la salud humana no se podrá utilizar dicha agua para la producción y/o elaboración de alimentos hasta tanto se obtenga un resultado satisfactorio de la muestra problema.

Todas las acciones correctivas deben presentarse por escrito al SIV para que el mismo proceda a la verificación de lo actuado y su posterior archivo.

En la Circular 4247/2016 podrán encontrar mayores detalles respecto de los criterios de acción, como así también recomendaciones para el lavado y desinfección de tanques, cisternas e instalaciones de agua; y desinfecciones de pozos.

**ANEXO 5.** Parámetros para contaminantes químicos en agua potable según CAA, China y UE.

<b>CAA Art. 982</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>China (GB 5749-2022)</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>UE (directiva (UE) 2020/2184)</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>
Níquel total	20	µg/l	Níquel total	20	µg/l	Níquel total	20	µg/l
			Sodio	200	mg/l	Sodio	200	mg/l
Selenio total	10	µg/l	Selenio total	10	µg/l	Selenio total	20	µg/l
Boro total	0,5	mg/l	Boro total	1	mg/l	Boro total	1,5	mg/l
Antimonio total	20	µg/l	Antimonio total	5	µg/l	Antimonio total	10	µg/l
			Bario total	700	µg/l			
			Berilio total	2	µg/l			
			Talio total	0,1	µg/l			
Plata total	50	µg/l	Plata total	50	µg/l			
			Molibdeno total	70	µg/l			
Hierro total	300	µg/l	Hierro total	300	µg/l	Hierro total	200	µg/l
Manganoso total	100	µg/l	Manganoso total	100	µg/l	Manganoso total	50	µg/l
Plomo total	50	µg/l	Plomo total	10	µg/l	Plomo total	10	µg/l
Cadmio total	5	µg/l	Cadmio total	5	µg/l	Cadmio total	5	µg/l
Cobre total	1000	µg/l	Cobre total	1	mg/l	Cobre total	2	mg/l
Arsénico total	50	µg/l	Arsénico total	10	µg/l	Arsénico total	10	µg/l
Aluminio total	200	µg/l	Aluminio total	200	µg/l	Aluminio total	200	µg/l
						Uranio	30	µg/l
Cromo	50	µg/l	Cromo hexavalente	50	µg/l	Cromo	50	µg/l
Cinc	5	µg/l	Cinc	1000	µg/l			
Mercurio	1	µg/l	Mercurio	1	µg/l	Mercurio	1	µg/l

**Volátiles y semivolátiles orgánicos**

<b>CAA art. 982</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>China (GB 5749-2022)</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>UE (directiva (UE) 2020/2184)</b>		<b>Unidad</b>
1,2 dicloroetano	10	µg/l	1,2 dicloroetano	30	µg/l	1,2 dicloroetano	3	µg/l
Tricloroetileno	30	µg/l	Tricloroetileno	20	µg/l	Tricloroetileno + tetracloroeteno	10	µg/l
Tetracloroeteno	10	µg/l	Tetracloroeteno	40	µg/l			
Benceno (GC/MS)	10	µg/l	Benceno (GC/MS)	10	µg/l	Benceno (GC/MS)	1	µg/l
Cloruro de vinilo	2	µg/l	Cloruro de vinilo	1	µg/l	Cloruro de vinilo	0,5	µg/l
Trihalometanos (THM)	100	µg/l	Trihalometanos (THM)	1000	µg/l	Trihalometanos (THM)	100	µg/l
			Ácido dicloroacético	50	µg/l	Ácido haloacéticos (dicloroacético + tricloroacético + monocloroacético +monobromoacético + dibromoacético)	60	µg/l
			Ácido tricloroacético	100	µg/l			
1,1 dicloroeteno	0,3	µg/l	1,1 dicloroeteno	30	µg/l			
1,2 diclorobenceno	0,5	µg/l						
1,4 diclorobenceno	0,4	µg/l	1,4 diclorobenceno	300	µg/l			

**ANEXO 5. Parámetros para contaminantes químicos en agua potable según CAA, China y UE.**

CAA Art. 982	LMR	Unidad	China (GB 5749-2022)	LMR	Unidad	UE (directiva (UE) 2020/2184)	LMR	Unidad
Tetracloruro de carbono	3	µg/l	Tetracloruro de carbono	2	µg/l			
Clorobenceno	3	µg/l	Clorobenceno	300	µg/l			
			Diclorometano	20	µg/l			
			1,2-dicloroeteno (cis)	50	µg/l			
			Estireno	20	µg/l			
			Triclorobenceno (total)	20	µg/l			
			Tolueno (GC/MS)	700	µg/l			
			Hexacloro-1,3-butadieno	0,6	µg/l			
			xilenos	500	µg/l			
Benzo(a) pireno	0,01	µg/l	Benzo(a) pireno	0,01	µg/l	Benzo(a) pireno	0,01	µg/l
						Benzo(b)fluoranteno + benzo(k)fluoranteno + benzo(ghi) perileno + indeno(1,2,3-cd) pireno	0,1	µg/l
2.4.6 - triclorofenol	10	µg/l	2.4.6 - triclorofenol	200	µg/l			
			Ftalato de bis (2-etilhexilo)	8	µg/l			
Pentaclorofenol	10	µg/l	Pentaclorofenol	9	µg/l			
			Fenoles volátiles	2	µg/l			

**Plaguicidas**

CAA art. 982	LMR	Unidad	China (GB 5749-2022)	LMR	Unidad	UE (directiva (UE) 2020/2184) (1)	LMR	Unidad
Heptacloro + Heptacloroepóxido	0,1	µg/l	Heptacloro	0,4	µg/l	Heptacloro + Heptacloroepóxido	0,03	µg/l
Malation	35	µg/l	Malation	250	µg/l	Malation	0,1	µg/l
Hexaclorobenceno (HCB)	0,01	µg/l	Hexaclorobenceno (HCB)	1	µg/l	Hexaclorobenceno (HCB)	0,1	µg/l
			Clorpirifos etil	30	µg/l	Clorpirifos etil	0,1	µg/l
			Deltametrina	20	µg/l	Deltametrina	0,1	µg/l
			Furadan (carbofuran)	7	µg/l	Carbofuran	0,1	µg/l
			Atrazina	2	µg/l	Atrazina	0,1	µg/l
			Dimetoato	6	µg/l	Dimetoato	0,1	µg/l
						Aclonifen	0,1	µg/l
						Alaclor	0,1	µg/l
						Aldrin	0,1	µg/l
						Azaconazole	0,1	µg/l
						Azinfos -etil	0,1	µg/l
						Bifentrin	0,1	µg/l
						Boscalid	0,1	µg/l
						Bromocyclen	0,1	µg/l
						Bromofos-etil	0,1	µg/l

**ANEXO 5. Parámetros para contaminantes químicos en agua potable según CAA, China y UE.**

<b>CAA Art. 982</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>China (GB 5749-2022)</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>UE (directiva (UE) 2020/2184)</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>
						Bromofos metil	0,1	µg/l
						Bromopropilato	0,1	µg/l
						Bupirimato	0,1	µg/l
						Buprofezin	0,1	µg/l
						Carbofenotion	0,1	µg/l
						Captan	0,1	µg/l
						Cifluthrina	0,1	µg/l
						Metil azinfos	0,1	µg/l
						Ciproconazole	0,1	µg/l
						Clorfenvinfos	0,1	µg/l
						Clorpirimfos metil	0,1	µg/l
						Cyprodinil	0,1	µg/l
						Diazinon	0,1	µg/l
						Diclofention	0,1	µg/l
						Dicloran	0,1	µg/l
Aldrin + dieldrin	0,03	µg/l				Aldrin + Dieldrin	0,03	µg/l
						Difenilamina	0,1	µg/l
						Endrin	0,1	µg/l
						Epn	0,1	µg/l
						Etion	0,1	µg/l
						Etoprofos	0,1	µg/l
						Fenarimol	0,1	µg/l
						Fenazaquin	0,1	µg/l
						Fenpropatrina	0,1	µg/l
						Fentoato	0,1	µg/l
						Fenvalerato	0,1	µg/l
						Fludioxonil	0,1	µg/l
						Flusilazole	0,1	µg/l
						Fosalone	0,1	µg/l
						Fosmet	0,1	µg/l
						Hch, alpha	0,1	µg/l
						Hch, beta	0,1	µg/l
						Hch, delta	0,1	µg/l
						Hexaconazole	0,1	µg/l
						Iprodione	0,1	µg/l
						Lambda-cihalotrina	0,1	µg/l
Lindano (gamma-hch)	3	µg/l				Lindano (gamma-hch)	0,1	µg/l
						Metalaxyl	0,1	µg/l
						Metidation	0,1	µg/l
Metoxicloro	30	µg/l				Metoxicloro	0,1	µg/l
						Miclobutanol	0,1	µg/l
						O-fenilfenol	0,1	µg/l
						Oxifluorfen	0,1	µg/l
						Dicofol (4,4-dicloro-benzofenona)	0,1	µg/l
						Penconazole	0,1	µg/l

**ANEXO 5. Parámetros para contaminantes químicos en agua potable según CAA, China y UE.**

<b>CAA Art. 982</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>China (GB 5749-2022)</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>UE (directiva (UE) 2020/2184)</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>
Paration - etil	35	µg/l				Paration - etil	0,1	µg/l
Paration - metil	7	µg/l				Paration - metil	0,1	µg/l
						Pendimetalin	0,1	µg/l
						Permetrina	0,1	µg/l
						Piridafention	0,1	µg/l
						Pirimifos - metil	0,1	µg/l
						Procimidone	0,1	µg/l
						Propiconazol	0,1	µg/l
						Quinoxifen	0,1	µg/l
						Tau- fluvalinato	0,1	µg/l
						Tebuconazole	0,1	µg/l
						Tetraclorvinfos	0,1	µg/l
						Tetradifon	0,1	µg/l
						Triazofos	0,1	µg/l
						Trifluralina	0,1	µg/l
						Vinclozolin	0,1	µg/l
						Flumetralin	0,1	µg/l
						Cipermetrina	0,1	µg/l
						Fenitroton	0,1	µg/l
						Tolclofos metil	0,1	µg/l
						Isofenfos metil	0,1	µg/l
						Clorprofam	0,1	µg/l
						Isofenfos etil	0,1	µg/l
						Metolaclor	0,1	µg/l
						Napropamida	0,1	µg/l
						Clorobencilato	0,1	µg/l
						Etofenprox	0,1	µg/l
						Clortal dimetil	0,1	µg/l
						Profenofos	0,1	µg/l
						Acetoclor	0,1	µg/l
						Cianofos	0,1	µg/l
						Clomazona	0,1	µg/l
						Clorfenson	0,1	µg/l
						Cloroneb	0,1	µg/l
						Diclobenil	0,1	µg/l
						Diclobutrazol	0,1	µg/l
						Difenamid	0,1	µg/l
						Dimetenamid	0,1	µg/l
						Etaconazole	0,1	µg/l
						Etrimfos	0,1	µg/l
						Fenson	0,1	µg/l
						Flucitrinato i	0,1	µg/l
						Furalaxil	0,1	µg/l
						Heptenofos	0,1	µg/l
						Iprobenfos	0,1	µg/l
						Izasofos	0,1	µg/l
						Leptofos	0,1	µg/l

**ANEXO 5. Parámetros para contaminantes químicos en agua potable según CAA, China y UE.**

<b>CAA Art. 982</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>China (GB 5749-2022)</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>UE (directiva (UE) 2020/2184)</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>
						Metribuzin	0,1	µg/l
						Mevinfos	0,1	µg/l
						Mirex	0,1	µg/l
						Nitrapirin	0,1	µg/l
						Nitrofeno	0,1	µg/l
						Oxadiazon	0,1	µg/l
						Pentacloroanilina	0,1	µg/l
						Pentacloroanisol	0,1	µg/l
						Pertane (1,1-dicloro-2,2-bis (4-etilfenil) etano)	0,1	µg/l
						Pirazofos	0,1	µg/l
						Pirifeno i	0,1	µg/l
						Profam	0,1	µg/l
						Profluralina	0,1	µg/l
						Propacloro	0,1	µg/l
						Propetamfos	0,1	µg/l
						Quinalfos	0,1	µg/l
						Quintoceno	0,1	µg/l
						Tebufenpirad	0,1	µg/l
						Tecnazeno	0,1	µg/l
						Terbacilo	0,1	µg/l
						Endosulfan (alfa)	0,1	µg/l
						Endosulfan (beta)	0,1	µg/l
						Endosulfan sulfato	0,1	µg/l
DDT	1	µg/l				DDT	0,1	µg/l
						Flucitrinato ii	0,1	µg/l
						Pirifeno ii	0,1	µg/l
						Flutriafol	0,1	µg/l
						Epoxiconazole	0,1	µg/l
						1,2,3,6-tetrahi- droftalimida (THFI)	0,1	µg/l
Clordano	0,3	µg/l				Clordano	0,1	µg/l
						Fenbuconazole	0,1	µg/l
						Clorantraniliprole	0,1	µg/l
						Difenoconazole	0,1	µg/l
						Butóxido de piperonilo	0,1	µg/l
						Imidacloprid	0,1	µg/l
						Tiacloprid	0,1	µg/l
						Acetamiprid	0,1	µg/l
						Spinosin a	0,1	µg/l
						Metoxifenocide	0,1	µg/l
						Spirodiclofen	0,1	µg/l
						Hexitiazox	0,1	µg/l
						Benomil/carbendazim	0,1	µg/l
						Tiabendazol	0,1	µg/l

**ANEXO 5. Parámetros para contaminantes químicos en agua potable según CAA, China y UE.**

CAA Art. 982	LMR	Unidad	China (GB 5749-2022)	LMR	Unidad	UE (directiva (UE) 2020/2184)	LMR	Unidad
						Imazalil	0,1	µg/l
						Azoxistrobina	0,1	µg/l
						Fenhexamid	0,1	µg/l
						Prochloraz	0,1	µg/l
						Tebufenozide	0,1	µg/l
						Kresoxim-metil	0,1	µg/l
						Piraclostrobin	0,1	µg/l
						Trifloxistrobina	0,1	µg/l
						Fenpiroximato	0,1	µg/l
						Pirimicarb	0,1	µg/l
						Terbumeton	0,1	µg/l
						Simazina	0,1	µg/l
						Pirimetanil	0,1	µg/l
						Carbaril	0,1	µg/l
						Tiodicarb	0,1	µg/l
						Diuron	0,1	µg/l
						Terbutrina	0,1	µg/l
						Linuron	0,1	µg/l
						Terbutilazina	0,1	µg/l
						Metiocarb	0,1	µg/l
						Iprovalicarb	0,1	µg/l
						Diflubenzuron	0,1	µg/l
						Fenoxicarb	0,1	µg/l
						Benalaxil	0,1	µg/l
						Prosulfocarb	0,1	µg/l
						Lufenuron	0,1	µg/l
						Oxamil	0,1	µg/l
						Abamectina	0,1	µg/l
						Fipronil	0,1	µg/l
						Piriproxifen	0,1	µg/l
						Propargite	0,1	µg/l
						Indoxacarb	0,1	µg/l
						Espirotetramato	0,1	µg/l
						Metomil	0,1	µg/l
						Triadimefon	0,1	µg/l
						Triadimenol	0,1	µg/l
						Mepanipirim	0,1	µg/l
						Fosfamidon	0,1	µg/l
						Paclobutrazol	0,1	µg/l
						Fenpropimorf	0,1	µg/l
						Fenamifos	0,1	µg/l
						Dietofencarb	0,1	µg/l
						Carfentrazone-etil	0,1	µg/l
						Bensulide	0,1	µg/l
						Coumafos	0,1	µg/l
						Triflumizole	0,1	µg/l
						Sulfotep	0,1	µg/l

**ANEXO 5. Parámetros para contaminantes químicos en agua potable según CAA, China y UE.**

<b>CAA Art. 982</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>China (GB 5749-2022)</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>UE (directiva (UE) 2020/2184)</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>
						Fensulfotion	0,1	µg/l
						Cloroxuron	0,1	µg/l
						Ofurace	0,1	µg/l
						Metazacloro	0,1	µg/l
						Fonofos	0,1	µg/l
						Prometrina	0,1	µg/l
						Dicrotofos	0,1	µg/l
						Ametrina	0,1	µg/l
						Monolinuron	0,1	µg/l
						Propoxur	0,1	µg/l
						Aminocarb	0,1	µg/l
						Cimoxanilo	0,1	µg/l
						Teflubenzuron	0,1	µg/l
						Metabenztiazuron	0,1	µg/l
						Propizamida	0,1	µg/l
						Triflumuron	0,1	µg/l
						Ciantraniliprole	0,1	µg/l
						Propazina	0,1	µg/l
						Famofos	0,1	µg/l
						Spinosin d	0,1	µg/l
						Spinosad	0,1	µg/l
						Triadimefon /triadimenol	0,1	µg/l
			Clorotalonil	10	µg/l	Clorotalonil	0,1	µg/l
			Equigard (diclorvos)	1	µg/l	Equigard (diclorvos)	0,1	µg/l
2,4-d	100	µg/l	2,4-d	30	µg/l	2,4-d	0,1	µg/l
			Bentazon	300	µg/l	Bentazon	0,1	µg/l
						Suma de plaguicidas	0,5	µg/l

**Índices radioactivos**

<b>CAA art. 982</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>China (GB 5749-2022)</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>UE (directiva (UE) 2020/2184) (1)</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>
			Radiactividad α total (bq/l)	0,5	(bq/l)			
			Radiactividad β total (bq/l)	1	(bq/l)			

**ANEXO 5.** Parámetros para contaminantes químicos en agua potable según CAA, China y UE.

otros								
<b>CAA art. 982</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>China (GB 5749-2022)</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>	<b>UE (directiva (UE) 2020/2184) (1)</b>	<b>LMR</b>	<b>Unidad</b>
			Clorito	700	µg/l	Clorito	250	µg/l
			Clorato	700	µg/l	Clorato	250	µg/l
			Acrilamida	0,5	µg/l	Acrilamida	0,1	µg/l
			Epoxicloropropil burn	0,4	µg/l			
			Microcystina lr	1	µg/l	Microcystina lr	1	µg/l
			2 - metilisodiol	0,01	µg/l			
			Desodorina	0,01	µg/l			
						Bisfenol a	2,5	µg/l
						Epiclorhidrina	0,1	µg/l
						Sustancias perfluoroalquiladas y polifluoroalquiladas (PFAS)	0,5	µg/l

## REFERENCIAS

3M Environmental monitoring handbook for the food and beverage industries. 1st edition. Cornell University.

3M. Disponible en: <https://www.3m.com.ar/>

Abebe E, Gugsa G, Ahmed M. Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens. J Trop Med. 2020;4674235. DOI: 10.1155/2020/4674235

Agrinea. Disponible en: <https://agrinea.com/>

Alía A, Andrade MJ, Córdoba JJ, Martín I, Rodríguez A. Development of a multiplex real-time PCR to differentiate the four major *Listeria monocytogenes* serotypes in isolates from meat processing plants. Food Microbiol. 2020;87:103367

Almond Board of California. Programa de monitoreo ambiental de patógenos (MAP). Prevención de recontaminación por *Salmonella*: spp. Documento guía del Programa de Monitoreo Ambiental de Patógenos. 2010.

Área de Vigilancia de la Salud de la Dirección de Epidemiología. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Boletín Integrado de Vigilancia N° 481. 2020. Disponible en: [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv\\_481\\_edicion\\_ampliada.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv_481_edicion_ampliada.pdf)

Augustin JC, Kooh P, Mughini-Gras L, Guillier L, Thébault A, Audiat-Perrin F, Cadavez V, Gonzales-Barron U, Sana M. Risk factors for sporadic infections caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a systematic review and meta-analysis. Microb Risk Anal. 2021;17:100117. DOI: 10.1016/j.mran.2020.100117

Baeza Quiroz CB. Aislamiento y caracterización de cepas de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga desde carne de vacuno nacional e importada, distribuida en los principales supermercados de la provincia de Santiago. Tesis Magíster en Salud Pública y Sistema de Salud 2013. Escuela de Salud Pública. Universidad Mayor. Disponible en: <https://1library.co/document/ye9e2req-aislamiento-caracterizacion-escherichia-productor-shigatoxina-distribuida-principales-supermercados.html>

Bantawa K, Rai K, Subba Limbu D, Khanal H. Foodborne bacterial pathogens in marketed raw meat of Dharan, eastern Nepal. BMC Res Notes. 2018;11:618. DOI: 10.1186/s13104-018-3722-x. PMID: 30157961; PMCID: PMC6114039.

Barreto M, Castillo-Ruiz M, Retamal P. *Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. Rev Chil Infectol. 2016;33:547-57.

Biomerieux. Disponible en: <https://www.biomerieux.es/>

Bioseguridad-en-el-Laboratorio-de-Microbiología-de-Alimentos, Dirección de Bromatología de Neuquén. Disponible en: <https://www.saludneuquen.gob.ar/wp-content/uploads/2021/08/11-Bioseguridad-en-el-Laboratorio-de-Microbiología-de-Alimentos-convertido.pdf>

Bosilevac JM, Gassem MA, Al Shedly IA, Alaiman SA, Al-Mohizea IS, Alowaimer A, Koohmariae. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in camels, cattle, goats, and sheep harvested for meat in Riyadh. J Food Prot. 2015;78:89-96. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-14-176

Brusa V, Blainq L, Brasesco H, Brussone M, Buezas J, Contardi I, García D, Gómez E, Mariame M, Medici L, Moretti G, Ochoa G, Petroli S, Superno V, Sucari A, Dolev S, Vinelli F, Albanese R, Signorini M, Leotta GA. Detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and microbial population counts on Argentinean Kosher beef for export to Israel. Analecta Vet. 2023. DOI: 10.24215/15142590e071.

Brusa V, Cap M, Leotta G, Signorini M, Vaudagna S. Quantitative Microbial Risk Assessment of Haemolytic Uremic Syndrome due to Beef Consumption: Impact of Interventions to Reduce the Presence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. En: Torres AG, ed. Trending topics in *Escherichia coli* research. The latin american perspective. 2º edición, Switzerland, Springer International Publishing, 2023.

Brusa V, Costa M, Padola NL, Etcheverría A, Sampedro F, Fernandez PS, Leotta GA, Signorini M. Quantitative risk assessment of haemolytic uremic syndrome associated with beef consumption in Argentina. PLoS One. 2020; 13;15(11):e0242317. DOI: 10.1371/journal.pone.0242317

Brusa V, Restovich V, Galli L, Teitelbaum D, Signorini M, Brasesco H, Londero A, García D, Padola NL, Superno V, Sanz M, Petrolí S, Costa M, Bruzzone M, Sucari A, Ferreghini M, Linares L, Suberbé G, Rodríguez R, Leotta GA. Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from beef carcasses, cuts and trimmings of abattoirs in Argentina. PLoS One. 2017;12:16. DOI: 10.1371/journal.pone.0183248.

Brusa V, Restovich V, Signorini M, Pugin D, Galli L, Diaz VR, Arias R, Leotta GA. Evaluation of intervention measures at different stages of the production chain in Argentinian exporting abattoirs. Food Sci Technol Int. 2019;25(6):6. DOI: 10.1177/1082013219836326.

Buncic S, Nychas GJ, Lee MR, Koutsoumanis K, Hébraud M, Desvaux M, Chorianopoulos N, Bolton D, Blagojevic B, Antic D. Microbial pathogen control in the beef chain: recent research advances. Meat Sci. 2014;97:288-97. DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.04.040.

Casas DE, Vargas DA, Randazzo E, Lynn D, Echeverry A, Brasheras MM, Sanchez Plata M, Miller MF. In-Plant Validation of Novel On-Site Ozone Generation Technology (Bio-Safe) Compared to Lactic Acid Beef Carcasses and Trim Using Natural Microbiota and *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 Surrogate Enumeration. Foods. 2021;10(5):1002. DOI: 10.3390/foods10051002.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Disponible en: <https://www.cdc.gov/foodnetfast/HUS>

Circular SENASA 4247/2016.

Circular SENASA N° 3259.

Circular SENASA N° 3834.

Circular SENASA N° 3940.

Circular SENASA N° 4032A.

Circular SENASA N° 4245A.

Circular SENASA N° 4247.

Circular SENASA N° 4210B.

*Codex Alimentarius* (FAO/OMS). Disponible en: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/>

*Codex Alimentarius* (FAO/OMS). Principios de Aplicación Práctica para el Análisis de Riesgos. 2003. Disponible en: <https://www.fao.org/3/y5817s/Y5817S04.htm>

Código Alimentario Argentina. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>

Compact Dry. Disponible en: <https://compact-dry.com/>

Compendio de Métodos de Análisis Microbiológico de Alimentos (Compendio de Métodos para el Examen Microbiológico de Alimentos - APHA). Disponible en: <https://www.fao.org/3/t0451s/t0451s.pdf>

Costa M, Brusa V, Londero A, Galli L, Leotta GA. Molecular subtyping of *Salmonella* spp. strains in provincial abattoirs with no hazard analysis critical control point from Buenos Aires, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2022;54:31-40. DOI: 10.1016/j.ram.2022.02.004

Costa M, Brusa V, Padola NL, Etcheverría A, Sanpedro F, Fernández PS, Leotta GA, Signorini M. Analysis of scenarios to reduce the probability of acquiring hemolytic uremic syndrome associated with beef consumption. Food Sci Technol Int. 2021;28:613-21. DOI: 10.1177/10820132211046124.

Costa M, Londero A, Brusa V, Galli L, Van Der Ploeg C, Roge A, Leotta GA. Characterization and molecular subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in provincial abattoirs from the Province of Buenos Aires, Argentina, during 2016-2018. Prev Vet Med. 2020;183:105133. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2020.105133.

Curso de Gestión de Calidad para Laboratorios. Módulo 11. Bioseguridad. Organización Panamericana de la Salud 2005. Disponible en: <https://www3.paho.org/Spanish/AD/THS/EV/labs-CGC-MOD11.pdf>

Dickson JS, Acuff GR. Maintaining the safety and quality of beef carcass meat. En: Acuff GR; Dickson JS, editors. Ensuring Safety and Quality in the Production of Beef. Cambridge, Burleigh Dodds Science Publishing, 2017, pp. 145–167

Dirección de Epidemiología. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Boletín Epidemiológico Nacional N° 611. 2022. Disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2022-07/BEN-611-SE-29.pdf>

Directiva (UE) 2020/2184. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020L2184>.

Directrices Generales sobre muestreo (Codex Alimentarius CAC/GL 50-2004). Disponible en: [https://www.fao.org/faowho-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXG%2B50-2004%252FCXG\\_050s.pdf](https://www.fao.org/faowho-codexalimentarius/sh-proxy/es/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXG%2B50-2004%252FCXG_050s.pdf)

Donnenberg MS, Hazen TH, Farag TH, Panchalingam S, Antonio M, Hossain A, Mandomando I, Ochieng JB, Ramamurthy T, Tamboura B, Zaida A, Levine MM, Kotloff K, raski DA, Nataro JP. Bacterial factors associated with lethal outcome of enteropathogenic *Escherichia coli* infection: genomic case-control studies. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9:e0003791. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003791

Doyle Beuchat y Montville: Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y Fronteras. 2001. ISBN: 84-200-0933-4

EFSA (BIOHAZ) Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. EFSA J. 2020;18(1):105. DOI: 10.2903/j.efsa.2020.5967

EFSA. (BIOHAZ) Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. EFSA Journal. 2013;11:3138. DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3138

Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). Disponible en: <https://www.enac.es>

Etcheverría AI, Padola NL, Sanz ME, Polifroni R, Kruger A, Passucci J, Rodríguez EM, Taraborelli AL, Ballerio M, Parma AE. Occurrence of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. Meat Sci. 2010;86:4. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.05.027

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infection Annual epidemiological report for 2019–2021. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/shiga-toxin-producing-escherichia-coli-stec-infection-annual-epidemiological#:~:text=For%202019%2C%2029%20EU%2FEEA,rate%20increased%20in%202018%E2%88%922019>.

Evaluación de riesgos microbiológicos en alimentos guía para implementación en los países. Organización Panamericana de la Salud 2021. Disponible en: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/53292/9789275323250\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/53292/9789275323250_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Farber JM, Zwietering M, Wiedmann M, Schaffner D, Hedberg CW, Harrison MA, Hartnett E, Chapman B, Donnelly CW, Goodburn KE, Gummalla S. Alternative approaches to the risk management of *Listeria monocytogenes* in low-risk foods. Food Control. 2021;123:10760

Farmacopea Brasileña. Disponible en: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/8031json-file-1>

Feng J, Xu K, Shi X, Xu L, Liu L, Wang F, Zhong X, Liu G, Wang J, Gao P, Ding J, Wang S, Zhan S. Incidence and cost of haemolytic uraemic syndrome in urban China: a national population-based analysis. BMC Nephrol. 2022;23:122. DOI: 10.1186/s12882-022-02746-2

Feng Y, Yao H, Chen S, Sun X, Yin Y, Jiao X. Rapid Detection of Hypervirulent Serovar 4h *Listeria monocytogenes* by Multiplex PCR. Front Microbiol. 2020;11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01309

Ferrari RG, Rosario DKA, Cunha-Neto A, Mano SB, Figueiredo EES, Conte-Junior CA. Worldwide Epidemiology of *Salmonella* Serovars in Animal-Based Foods: a Meta-analysis. Appl Environ Microbiol. 2019;85:1-21.

Figueroa Y. Estudio epidemiológico y serotipificación por PCR múltiple de *Listeria monocytogenes* aislada de matrices alimentarias en Argentina. Trabajo final para optar al título de Magíster en Microbiología Molecular otorgado por la Maestría en Microbiología Molecular. 11va cohorte. CNRL - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". 2022.

Gan L, Mao P, Jiang H, Zhang L, Liu D, Cao X, Wang Y, Wang Y, Sun H, Huang Y, Ye C. Two Prevalent subsp Clonal Strains With Different Virulence Exist in Wild Rodents and Pikas of China. Front Vet Sci. 2020;7:88.

GBT 17238-2008 Fresh and Frozen Beef, Cuts. Disponible en: [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/gbt\\_17238-2008\\_espanol.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/gbt_17238-2008_espanol.pdf).

GB-T 4789.6. Disponible en: <https://www.chinesestandard.net/PDF/English.aspx/GBT4789.6-2003>

Government of Canada. Preventive controls for *E. coli* O157/NM in raw beef products. Disponible en: <https://inspection.canada.ca/preventive-controls/meat/raw-beef-products/eng/1541538060346/1541538137261>.

Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, Praet N, Bellinger DC, de Silva NR, Gargouri N, Speybroeck N, Cawthorne A, Mathers C, Stein C, Angulo FJ, Devleesschauwer B. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS Med.* 2015;12:1-23.

Health Canada's Guidance Document on *E. coli* O157:H7 and *E. coli* O157:NM in Raw Beef. Disponible en: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/legislation-guidelines/guidance-documents/guidance-document-coliform-0157-coliform-0157-beef-2014.html>

Heredia N, Dávila-Aviña JE, Solís Soto L, García S. Productos cárnicos: principales patógenos y estrategias no térmicas de control. *NACAMEH.* 2014;8:20-42.

Heredia N, García S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Anim Nutri.* 2018;4:250-5.

Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M. Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. *Escherichia coli* O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2427-32. DOI: 10.1128/JCM.00321-15

Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Nishii H, Ohnishi M, Mekata H, Ogura Y, Hayashi T. Six Novel O Genotypes from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2016;7:765. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00765

Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM). Disponible en: <https://www.iram.org.ar>

Instrucao Normativa - In N° 161, De 1º de Julho de 2022. Disponible en: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN\\_161\\_2022\\_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2)

Instrução Normativa nº 9, de 08 de abril de 2009. Disponible en: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-de-patogenos/listeria-monocytogenes>

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 1986. Microorganisms in foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and Specific Applications. University of Toronto, 2nd. Edit. ISBN 0802056938.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 2011. Microorganisms in foods 8. Disponible en: <https://www.icmsf.org/publications/books/>

International Organization for Standardization (ISO). Disponible en: <https://www.iso.org>

IRAM-ISO 19011:2018. Directrices para la auditoría de los sistemas de gestión.

IRAM-ISO 9001:2015. Sistemas de gestión de la calidad - Requisitos.

IRAM-ISO-IEC 17025:2017: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

ISO 11290-1:2018. Microbiology of food chain. horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. Part 1: Detection method.

ISO 16654:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.

ISO 18593:2018. Microbiology of the food chain. Horizontal methods for surface sampling.

ISO 4833-1:2013/Amd 1:2022. Microbiology of the food chain. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique - Amendment 1: Clarification of scope.

ISO 6579-1:2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.

ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs.

ISO 8573-1:2010. Compressed air - Part 1: Contaminants and purity classes.

ISO/TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed - Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens - Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.

Jacquinet S, De Rauw K, Pierard D, Godefroid N, Collard L, Van Hoeck K, Sabe M. Haemolytic uremic syndrome surveillance in children less than 15 years in Belgium, 2009–2015. Arch. Public Health. 2018;76:41. DOI:10.1186/s13690-018-0289-x

JEMRA. Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment. World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring: report. World Health Organization. Microbiological risk assessment series. 2018; 31. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272871>

JEMRA. Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment. World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. Expert Meeting on Microbiological Risk Assessment (JEMRA) on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) associated with meat and dairy products. Virtual meeting, 1 to 26 June 2020. Summary report of the Joint FAO/WHO Expert Meeting on Microbiological Risk Assessment on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) associated with meat and dairy products. 2022. Disponible en: <https://www.fao.org/3/CB9139EN/CB9139EN.pdf>.

Keestra-Gounder AM, Tsolis RM, Bäumler AJ. Now you see me, now you don't: the interaction of *Salmonella* with innate immune receptors. Nat Rev Microbiol. 2015;13:206–16.

Kim JS, Lee MS, Kim JH. Recent Updates on Outbreaks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Its Potential Reservoirs. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:273. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00273.

Kirk MD, Pires SM, Black RE, Caipo M, Crump JA, Devleesschauwer B, Dopfer D, Fazil A, Fischer-Walker CL, Hald T, Hall AJ, Keddy KH, Lake RJ, Lanata CF, Torgerson PR, Havelaar AH, Angulo FJ. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis. PLoS Med. 2015;12:21. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001921

Knowlachuk J, Speir JL, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun. 1977;18:775–9. DOI: 10.1128/iai.18.3.775-779.1977

LaRock DL, Chaudhary A, Miller SI. Salmonellae interactions with host processes. Nat Rev Microbiol. 2015;13:191–205.

Leclercq, A., Moura, A., Vales, G., Tessaud-Rita, N., Aguilhon, C., Lecuit, M. *Listeria thailandensis* sp. Int J Syst Evol Microbiol. 2019;69:74–81.

León EA y Signorini M. Manual de Análisis de Riesgo. Aplicado a la sanidad Animal y la inocuidad de los alimentos. Fundación PROSAIA. 2020.

Leotta G.A. 2009. Métodos rápidos: una herramienta útil y práctica para el análisis Microbiológico de los alimentos. Revista Argentina de Microbiología 41: 63-64.

Leotta GA, Aliverti F, Aliverti V, Brocardo S, Brusa V., Epszteyn S, Galli L, Liron JP, Manfredi E, Pellicer K, Copes J. Métodos rápidos para la detección, caracterización y subtipificación de patógenos bacterianos presentes en alimentos. 2011. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Leotta GA, Brusa V, Galli L, Adriani C, Linares L, Etcheverría A, Sanz M, Sucari A, Peral García P, Signorini M. Comprehensive Evaluation and Implementation of Improvement Actions in Butcher Shops. PLoS One. 2016;12:1-16.

Lianou A, Panagou EZ, Nychas GJE. Meat Safety-I Foodborne Pathogens and Other Biological Issues. Lawrie's Meat Science. 2017:521–52. DOI: 10.1016/B978-0-08-100694-8.00017-0.

Loirat C, Fakhouri F, Ariceta G, Besbas N, Bitzan M, Bjerre A, Coppo R, Emma F, Johnson S, Karpman D, Landu D, Langman CB, Lapeyraque AL, Licht C, Nester C, Pecoraro C, Riedl M, van de Kar NCAJ, Van de Walle J, Vivarelli M, Frémeaux-Bracchi V, HUS International. An international consensus approach to the management of atypical hemolytic uremic syndrome in children. Pediatr Nephrol. 2016;31:15–39. DOI: 10.1007/s00467-015-3076-8.

Lopes-Luz L, Mendonça M, Bernardes Fogaça M, Kipnis A, Bhunia AK, Bührer-Sékula S. *Listeria monocytogenes*: review of pathogenesis and virulence determinants-targeted immunological assays. Crit Rev Microbiol. 2021;47:647–66. DOI: 10.1080/1040841X.2021.1911930

Majowicz SE, Scallan E, Jones-Bitton A, Sergeant JM, Stapleton J, Angulo FJ, Yeng DH, Kirk MD. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathog Dis.* 2014;11:17. DOI: 10.1089/fpd.2013.1704

Manual de bioseguridad en el laboratorio departamento diagnóstico y referencia. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Dr. Emilio Coni". Disponible en: [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/iner\\_1\\_-\\_manual-de-bioseguridad-en-el-laboratorio-version-final.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/iner_1_-_manual-de-bioseguridad-en-el-laboratorio-version-final.pdf)

Mercader JV, Abad-Somovilla A, Agulló C y Abad-Fuentes A. Aproximaciones inmunoanalíticas para el control de xenobióticos y biotoxinas en alimentos. *Arbor.* 2020;196:a542. DOI: 10.3989/arbor.2020.795n1006

Merck. Disponible en: <https://www.merckmillipore.com/AR/es>

Métodos Estándar para Análisis de Agua y Aguas Residuales (Métodos Estándar para el Examen de Agua y Aguas Residuales - APHA). Disponible en. <https://es.scribd.com/document/333277383/Metodos-Estandar-Para-El-Analisis-de-Agua-y-Aguas-Residuales>

Métodos Oficiales de Análisis de la AOAC Internacional. Disponible en: <https://www.aoac.org/>

Michanie, S. Monitoreo de la higiene de superficies. En: Apuntes de Laboratorio. 2013. Britania.

Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Encuesta Nacional de Nutrición y Salud. 2012. Disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recursoc/2deg-encuesta-nacional-de-nutricion-y-salud-indicadores-priorizados>.

Ministry for Primary Industries. New Zealand Government. Annual report concerning Foodborne Diseases in New Zealand 2020. New Zealand Food Safety Technical PaperNo: 2021/16. 2021. ISBN No: 978-1-99-101934-9 (online) ISSN No: 2624-022X (online).

Mitamura K, Shimizu H, Yamazaki M, Ichikawa M, Nagai K, Katada J, Wada A, Kawakami C, Sugaya N. Clinical evaluation of highly sensitive silver amplification immunochromatography systems for rapid diagnosis of influenza. *J Virol Methods.* 2013;194:123-8.

MT08. Sampling program for imported raw ground beef products. Imported raw ground beef products are analyzed for STEC and *Salmonella*. Disponible en: [https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media\\_file/2020-07/10010.1.pdf](https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2020-07/10010.1.pdf)

MT51. Sampling program for imported beef manufacturing trimmings and other components. Imported beef manufacturing trimmings and other components are sampled for STEC and *Salmonella*. Disponible en: [https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media\\_file/2020-07/10010.1.pdf](https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2020-07/10010.1.pdf)

Nakashima AA, González-Barrón U, Bouchriti N, Hartnett E, Karunasagar I, Kiermeier A, Koutsoumanis K, Li FQ, Ross T, Schaffner D, Signorini ML, Wang B, Zwietering M. Microbiological Risk Assessment. Guidance for Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (FAO/OMS), editors. 2021:267. ISSN 1728-0605.

Norma BRCGS version 9. 2023.

Norma Nacional de la República Popular China GB 5749-2022.

Norma Nacional de la República Popular China GB/T 17238-2008.

O'Brien AD, La Veck GD, Thompson MR, Formal SB. Production of *Shigella dysenteriae* type-1- like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1982;146:763-9. DOI: 10.1093/infdis/146.6.763

Oludairo O, Kwaga J, Kabir J, Abdu P, Gitanjali A, Perrets A, Cibin V, Lettini A, Aiyedun J. A Review on *Salmonella* characteristics, taxonomy, nomenclature with special reference to non-typhoidal and typhoidal salmonellosis. *Zagazig Vet J.* 2022;50(2):161-76. DOI: 10.21608/zvjz.2022.137946.1179

Organismo Argentino de Acreditación. Disponible en: <https://oaa.org.ar>

Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2017. Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP). Disponible en: <https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2017/food-safety-hacpp-cha-analisis-peligros-puntos-criticos-control.pdf>

Outsourcing: Tercerización de ensayos. Pautas para la selección del laboratorio adecuado. Lic. Silvia Trajtemberg. 2020. <https://indufarma.com.uy/indufarma-setiembre-2020/>

Pérez Terrazzino G, Costa M, López Campo A, Saade C, Moreno Mochi MP, Signorini M, Roge A, Van Der Ploeg C, Leotta G, Jure MÁ. Comprehensive evaluation of abattoirs with no Hazard Analysis Critical Control Point plan in Tucumán, Argentina. Rev Argent Microbiol. 2023;S0325-7541 00105-5. DOI: 10.1016/j.ram.2022.11.003.

Popa GL, Papa MI. *Salmonella* spp. infection - a continuous threat worldwide. Germs. 2021;15;11:88-96. DOI: 10.18683/germs.2021.1244. PMID: 33898345; PMCID: PMC8057844.

Principios y directrices para la aplicación de la gestión de riesgos microbiológicos (*Codex Alimentarius* CAC/GL 63-2007).

Quiróz Cárdenas S. TEMA -2016: Infecciones por bacterias del género *Salmonella*: Relevancia en la práctica clínica. Rev Clín Esc Med UCR - HSJD. 2016;6(IV)

Ramírez Mérida LG, Morón de Salim A, Alfieri Graterol AY, Gamboa O. Detección de *Listeria monocytogenes* en queso blanco criollo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Arch Latinoam Nutr. 2010;60. Disponible en: <http://www.alanrevista.org/ediciones/2010/3/art-7/>

Ramón, L.; Orjuela, E.; Rodríguez Cordero, D.; Carrascal Camacho, A.K. 2018. Programa de Monitoreo Ambiental para la industria porcina. ISBN 978-958-56855-1-2.

RASFF. Disponible en: [https://food.ec.europa.eu/safety/rasff\\_en](https://food.ec.europa.eu/safety/rasff_en)

Reglamento 2073/2005. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20180101&from=EN>

Reglamento Sanitario de los Alimentos (Chile - Actualización 26 de enero de 2023). Disponible en: <https://www.dinta.cl/wp-content/uploads/2023/03/RSA-decreto-977-96-act-al-26-01-23.pdf>

Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (Art 174). Disponible en: [https://www.minsal.cl/sites/default/files/files/DECRETO\\_977\\_96%20actualizado%20a%20Enero%202015\(1\).pdf](https://www.minsal.cl/sites/default/files/files/DECRETO_977_96%20actualizado%20a%20Enero%202015(1).pdf)

Rivera P, Fernando H, Wesley I, Hurd S, Simoes D, Sosa A, Rivera S. Determinación microbiológica y molecular de *Listeria* sp. y *Listeria monocytogenes* en cerdas a nivel de una planta beneficiadora en EUA. Rev Cient [online]. 2006;16(3):297-307. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592006000300012&lng=es&nrm=iso](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592006000300012&lng=es&nrm=iso). ISSN 0798-2259.

Robledo López A. Investigación de *Salmonella* spp. en alimentos mediante el método tradicional ISO 6579 y dos métodos inmunoenzimáticos. Universitat Politècnica de Catalunya. Escola Superior D'agricultura de Barcelona (Esab). Trabajo Final De Grado. 2015.

SanPin 2.3.2 1078-01. Disponible en: [https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/ia\\_eu\\_ru\\_sps-req\\_sanpin\\_2-3-2-1078-01 Consolidated\\_amend-22\\_en.pdf](https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/ia_eu_ru_sps-req_sanpin_2-3-2-1078-01 Consolidated_amend-22_en.pdf)

SENASA. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/senasa>

Shivendra V, Abhishek G, Shalini S. A review on food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* in foods. Egypt Exploration Fund. 2020;17:13514-28. Disponible en: <https://archives.palarch.nl/index.php/jae/article/view/5291>

Signorini M, Costa M, Teitelbaum D, Restovich V, Brasesco H, Garcia D, Superno V, Petroli S, Bruzzone M, Arduini V, Vanzini M, Sucari A, Suberbé G, Turina M, Rodríguez R, Leotta GA. Evaluation of decontamination efficacy of commonly used antimicrobial interventions for beef carcasses against Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Meat Sci. 2018;142:8. DOI: 10.1016/j.meatsci.2018.04.009

Torres AG, editor. *Escherichia coli* in the Americas. *Escherichia coli* in the Americas, 1º edición, Switzerland, Springer International Publishing, 2016. Disponible en: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-45092-6>

USDA. MLG 4.13 Title: Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges. 2023. Disponible en: [https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media\\_file/documents/MLG-4.13.pdf](https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/documents/MLG-4.13.pdf)

USDA. MLG 5C.03 Title: Detection, Isolation and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STECs) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. 2023. Disponible en: [https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media\\_file/documents/MLG-5C.03.pdf](https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/documents/MLG-5C.03.pdf)

USDA. MLG 8.13 Title: Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, ready-to-eat Siluriformes (Fish) and egg products and environmental samples. 2021. Disponible en: [https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media\\_file/2021-09/MLG-8.13.pdf](https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2021-09/MLG-8.13.pdf)

Vargas DA, Casas DE, Chávez-Velado DR, Jiménez RL, Betancourt-Barszcz GK, Randazzo E, Lynn A, Echeverry A, Brasheras MM, Sanchez-Plata M, Miller MF. In-Plant Intervention Validation of a Novel Ozone Generation Technology (Bio-Safe) Compared to Lactic Acid in Variety Meats. *Foods*. 2021;6:10:2106. DOI: 10.3390/foods10092106.

Wain J, Hendriksen RS, Mikoleit ML, Keddy KH, Ochiai RL. Typhoid fever. *Lancet*. 2015;385:1136–45.

# ABREVIATURAS

- $\mu\text{l}$ : microlitro
- 4MU: 4-methylumbelliferon
- AC: autoridad competente
- ACC: autoridad competente central
- ADN: ácido desoxirribonucléico
- AGC-CABA: Agencia Gubernamental de Control de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires
- ALOA: agar Listeria Ottaviani & Agostini
- ANLIS Malbrán: Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”
- APB: agua peptonada bufferada
- APHA: Asociación Americana de Salud Pública
- APPCC: Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
- APPCC-STEC: aplicación de APPCC identificando a STEC como un peligro
- APT: agua peptonada tamponada
- ARN: ácido ribonucléico
- AST: prueba de susceptibilidad antimicrobiana
- ATP: Adenosin Tri Fosfato
- BAL: bacterias ácido lácticas
- BAM: bacterias aerobias mesófilas
- BGS: agar verde brillante sulfato
- BIPM: Oficina Internacional de Pesas y Medidas
- BPH: buenas prácticas de higiene
- BPM: buenas prácticas de manufactura
- BRCGS: estándar global del consorcio minorista británico
- BS: agar sulfito de bismuto
- BSC: cabina de seguridad biológica
- BSL: Biosafety Level. Nivel de seguridad biológica
- CAA: Código Alimentario Argentino
- CAMP: Christie-Atkins-Munch-Peterson
- CF: caldo Fraser
- cm: centímetro
- COA: Certificados de Análisis
- CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
- CTSm: caldo tripticasa soja modificado
- CTSm+16: CTSm con 16 mg L<sup>-1</sup> de novobiocina
- CTSm+n: caldo tripticasa soja modificado con novobiocina
- CT-SMAC: agar MacConkey sorbitol con cefixima y telurito
- D: diarrea
- DAEC: *E. coli* de adherencia difusa
- DEC: *E. coli* diarréogénicas
- DMLIA: agar lisina hierro doblemente modificado
- DS: diarrea sanguinolenta
- EAEC: *E. coli* enteroagregativo
- EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
- EGHA: ácido hipocloroso generado electrolíticamente (agua electroactivada)
- EHEC: *E. coli* enterohemorrágico
- EIEC: *E. coli* enteroinvasivo
- ELFA: ensayo fluorescente ligado a enzimas
- ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
- EMS: Sistemas de Gestión Ambiental
- EnMS: Sistemas de Gestión de Energía
- EPEC: *E. coli* enteropatógeno
- EPTIS: sistema europeo de información sobre pruebas de competencia
- ETA: enfermedades transmitidas por alimentos
- ETEC: *E. coli* enterotoxigénico
- ExPEC: *E. coli* extraintestinales
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- FDA-BAM: Manual Bacteriológico de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
- FSIS: Servicio de Inocuidad e Inspección de Alimentos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
- FSMS: Sistemas de Gestión de Seguridad Alimentaria
- FTIR: espectroscopia
- g: gramo
- GMO: organismos modificados genéticamente
- HEPA: detención de partículas de alta eficiencia
- HF: caldo Half Fraser
- IAAC: Cooperación Inter Americana de Acreditación
- IAF: Foro Internacional de Acreditación
- ICMSF: Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos
- ILAC: Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios
- INA: Instituto Nacional del Agua
- INEI: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas
- INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
- INTI: Instituto Nacional de Tecnología Industrial
- IRAM: Instituto Argentino de Normalización y Certificación
- ISMS: Sistemas de Gestión de Seguridad de la Información
- ISO: Organización Internacional de Normalización

- JEMRA: Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios
- KCN: cianuro de potasio
- Kg: kilogramo
- LAMP: amplificación isotérmica mediada por bucle
- LB: caldo Listeria enriquecimiento
- LCD: pantalla de cristal líquido
- LEE: lugar de borramiento de enterocitos
- Lesión A/E: lesión de adherencia y barrido
- LIA: agar lisina hierro
- MALDI-TOF: espectrometría de masas
- MDMS: Sistemas de Gestión de Dispositivos Médicos
- MDS: sistema de detección molecular
- mg: miligramo
- min: minuto
- MINSAL: Ministerio de Salud de la Nación
- MKTTn: caldo tetratentonato de Muller Kauffmann con novobiocina
- ml: mililitro
- MLA: Acuerdo de Reconocimiento Multilateral
- MLG: guía del laboratorio de microbiología USDA-FSIS
- mm: milímetro
- MOPS-BLEB: caldo *Listeria* tamponado con ácido morfolino propano sulfónico
- MOX: agar Oxford modificado
- MP: manual de Procedimiento
- MRA: acuerdo de reconocimiento mutuo
- mV: milivoltio
- NaOH: hidróxido de sodio
- NMP: número más probable
- Nº: número
- NSF: Fundación Nacional de Ciencia
- OAA: Organismo Argentino de Acreditación
- OEA: operador de empresa alimentaria
- OH&SMS: Sistemas de Gestión de Seguridad y Salud Ocupacional
- OIML: Organismo Internacional de Metrología Legal
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- ONPG: o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranósido
- OPS: Organización Panamericana de la Salud
- PAA: ácido peroxiacético
- PCA: agar de recuento en placa
- PCC: punto crítico de control
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- PCR-TR: PCR en tiempo real
- PG-07: programa general 7
- PMA: programa de monitoreo ambiental
- POES: procedimiento operativo estandarizado de saneamiento
- ppm: parte por millón
- QMS: sistemas de gestión de calidad
- qPCR: PCR en tiempo real cuantitativa
- RASFF: sistema de alerta rápida para alimentos y piensos
- RODAC: contacto directo del microorganismo con agar
- RTE: alimentos listos para el consumo
- RV: caldo Rappaport-Vassiliadis
- RVS: caldo Rappaport-Vassiliadis soja
- S/cm: Siemens/cm
- SanPin: reglamentos de la Federación Rusa
- SC: caldo de selenito y cistina
- SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
- SIM: separación inmunomagnética
- SIV: Servicio de Inspección Veterinaria
- STEC TOP SEVEN (O157, O26, O45, O103, O111, O121 y O145)
- STEC: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga
- STEC-SUH: síndrome urémico hemolítico causado por STEC
- SUH: síndrome urémico hemolítico
- T°: temperatura
- TSI: agar triple azúcar hierro
- TT: caldo tetratentonato (Hajna)
- TTC: tetrazolium
- UFC: unidades formadoras de colonias
- URL: unidades relativas de luz
- USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
- UV: ultravioleta
- UVM: caldo de la Universidad de Vermont modificado
- VTEC: *Escherichia coli* verotoxigénica
- WGS: secuenciación del genoma completo
- XLD: agar selectivo xilosa lisina desoxicolato
- YGC: agar levadura-glucosa-cloranfenicol



## Consorcio de Exportadores de Carnes Argentinas

### MANUAL PARA LABORATORIOS DE PLANTAS FRIGORÍFICAS BOVINAS

Editor: Gerardo A. Leotta

Obra financiada por el Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina (IPCVA)

Diseño editorial: Natalia Esteller

1º edición enero 2024 - Buenos Aires.  
250p.; 21x29,7 cm

ISBN 978-631-90379-0-6

Prohibida la reproducción total o parcial, el almacenamiento, alquiler, la transmisión o la transformación de este manual, en cualquier forma o por cualquier medio, sea electrónico o mecánico, mediante fotocopias, digitalización u otros métodos, sin el permiso previo y escrito del editor. Su infracción está penada por las leyes 11.723 y 26.446 de la República Argentina.

El presente manual no tiene valor comercial. Su distribución es con fines de promoción científica y educación. Asimismo, cada autor de capítulo es responsable del texto incorporado y los recursos gráficos incluidos.

ISBN 978-631-90379-0-6

9 786319 037906