



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCIÓN DE POSGRADO Y FORMACIÓN CONTINUA

**INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGISTER EN
AGROINDUSTRIA**

MODALIDAD:

(Trabajo de Titulación)

TEMA:

**PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL PARA BACTERIAS
FORMADORAS DE HISTAMINA EN LÍNEA DE ATÚN PRECOCIDO
CONGELADO DE LA EMPRESA MARBELIZE S.A.**

AUTOR:

MARCOS ANTONIO ZAMBRANO ALCIVAR

TUTOR:

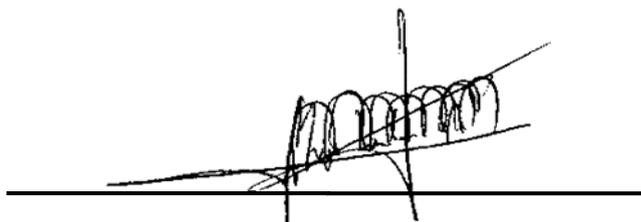
ING. DENNYS LENIN ZAMBRANO VELÁSQUEZ, Mg.

CALCETA, AGOSTO 2020

DERECHOS DE AUTORÍA

MARCOS ANTONIO ZAMBRANO ALCIVAR declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, que se han respetado los derechos de autor de terceros, por lo que asumo la responsabilidad sobre el contenido del mismo, así como ante la reclamación de terceros, conforme a los artículos 4, 5 y 6 de la Ley de Propiedad Intelectual.

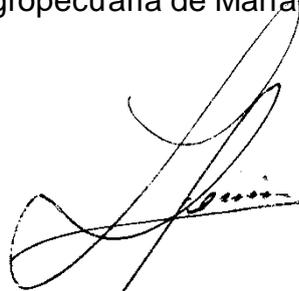
A través de la presente declaración cedo el derecho de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido en el artículo 46 de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a vertical stroke, positioned above a solid horizontal line.

MARCOS ANTONIO ZAMBRANO ALCIVAR

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

DENNYS LENIN ZAMBRANO VELÁSQUEZ, Mg., certifica haber tutelado el trabajo de titulación: **Programa de vigilancia ambiental de bacterias formadoras de histamina en línea de atún precocido congelado de la empresa Marbelize S.A.**, que ha sido desarrollado por **MARCOS ANTONIO ZAMBRANO ALCIVAR**, previo la obtención del título de Magister en Agroindustria, de acuerdo al Reglamento de unidad de titulación de los programas de Posgrado de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



ING. DENNYS LENIN ZAMBRANO VELÁSQUEZ, Mg.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

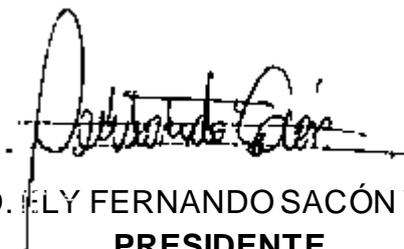
Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos **APROBADO** el trabajo de titulación: **Programa de vigilancia ambiental de bacterias formadoras de histamina en línea de atún precocido congelado de la empresa Marbelize S.A.** que ha sido propuesto, desarrollado y sustentado por **MARCOS ANTONIO ZAMBRANO ALCIVAR**, previa la obtención del título de Magister en Agroindustria, de acuerdo al Reglamento de la unidad de titulación de los programas de Posgrado de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



PhD. JULIO SALTOS SOLORZANO.
MIEMBRO



Mg. SOFIA VELÁSQUEZ CEDEÑO
MIEMBRO



PhD. ELY FERNANDO SACÓN VERA
PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

Como prioridad en la vida agradezco a Dios por su bondad, y por haber estado en los momentos en que lo necesitaba, por darme salud, fortaleza, responsabilidad y sabiduría, por haberme permitido culminar una más de mis metas.

A mis Padres, José Zambrano y Betsy Alcívar por ser los mejores, por haber estado conmigo apoyándome en momentos difíciles, por dedicar tiempo y esfuerzo para ser un hombre de bien, y darme excelentes consejos en mi diario caminar. A mis hermanos, José Luis Zambrano Alcivar y Nilda Zambrano Alcivar que con su ejemplo y dedicación me han instruido para seguir adelante en mi vida profesional.

De todo corazón aquella mujer muy especial, a quien amo mucho, mi esposa, Mayra Vianney Zambrano Mendoza, que con su valor y entrega ha sido una persona incondicional en mi vida, ha sido mi soporte, mi mejor amiga, mi consejera, mi apoyo, mi luz, mi guía, para seguir adelante y no bajar los brazos en los momentos difíciles, por su innegable dedicación, amor y paciencia.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, por abrir sus puertas y darme la oportunidad de crecer como ser humano a través de una educación superior de calidad y en la cual he forjado mis conocimientos profesionales día a día. A todo el excelente personal docente, administrativo y compañeros de la maestría en Agroindustria de la segunda cohorte.

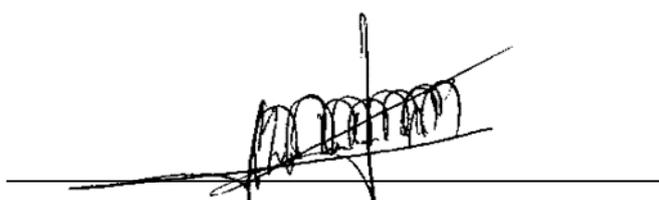
Agradezco de manera muy especial, al esfuerzo, dedicación, colaboración y sabiduría, del Ing. Lenin Zambrano Velásquez, Mg. tutor de esta tesis y a Ing. Viviana Solís Barzola, Mg. por su incansable labor y apertura en buscar cada día herramientas para mejorar los sistemas de seguridad alimentaria



MARCOS ANTONIO ZAMBRANO ALCIVAR

DEDICATORIA

Es mi deseo, como sencillo gesto de agradecimiento, dedicarle este trabajo plasmado en esta tesis, a mi esposa Mayra, a mis hijos Gian Marcos y Mayra Valentina quienes permanentemente me apoyaron con espíritu alentador, contribuyendo a las metas y objetivos propuestos



MARCOS ANTONIO ZAMBRANO ALCIVAR

CONTENIDO GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA.....	ii
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iv
AGRADECIMIENTO	v
DEDICATORIA.....	vi
CONTENIDO GENERAL.....	vii
CONTENIDO DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS	ix
RESUMEN	xi
PALABRAS CLAVE	xi
ABSTRACT	xii
KEY WORDS.....	xii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1.- PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2.- JUSTIFICACIÓN	4
1.3.- OBJETIVOS	6
1.3.1.- OBJETIVO GENERAL.....	6
1.3.1.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
1.4.- PREMISA	6
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1.- PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL.....	7
2.1.1.- UTILIDAD DEL PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL	8
2.1.2.- REQUISITOS DEL PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL	9
2.1.3.- CUANDO SE DEBE DE REVISAR UN PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL.....	10
2.2.- PROCESAMIENTO DEL ATÚN.....	10
2.2.1.- BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA.....	13
2.2.2.- MEDIOS DE CULTIVOS PARA DETERMINAR BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA	15
2.2.3.- PRUEBA DE CONFIRMACIÓN PARA BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA EN EL MEDIO MODIFICADO DE NIVEN 'S.....	19
2.2.4.- LÍMITES DE ACEPTACIÓN MICROBIOLÓGICOS EN AMBIENTES	20

2.3.- PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL PARA BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA.....	21
2.4.- UNIDAD DE ANÁLISIS.....	23
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	27
3.1.- UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	27
3.2.- DURACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	27
3.3.- MÉTODOS Y TÉCNICAS.....	27
3.4.- VARIABLES EN ESTUDIO	28
3.4.1.- VARIABLE INDEPENDIENTE.....	28
3.4.2.- VARIABLE DEPENDIENTE.....	28
3.5.- PROCEDIMIENTOS	28
3.5.1.- IDENTIFICACIÓN DE ZONA DE PRODUCTO EXPUESTO	28
3.5.2.- IDENTIFICACIÓN DE ZONAS DE MUESTREO.....	29
3.5.3.- PUNTOS DE TOMA DE MUESTRAS	30
3.5.4.- PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS.....	31
3.5.5.- FRECUENCIA DE ANÁLISIS.....	32
3.5.6.- MÉTODO DE ANÁLISIS PARA BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA.....	33
3.5.6.- LÍMITES DE CONTROL APROPIADOS PARA EL PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL	34
3.5.7.- DIAGRAMA DE HEURÍSTICO PARA LA ELABORACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	35
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
4.1.- ETAPAS DEL PROCESO DONDE SE APLICA EL PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL	37
4.2.- PRESENCIA DE BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA EN MUESTRAS DE SUPERFICIES Y AIRE EN ZONA DE PRODUCTO EXPUESTO DE RIESGO	41
4.3.- DESARROLLO DEL PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL.....	52
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
5.1.- CONCLUSIONES.....	54
5.2.- RECOMENDACIONES.....	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	63

CONTENIDO DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS

TABLAS:

Tabla 1 Composición de agar para análisis de bacterias formadoras de histamina descubierto por Niven et al (1981).	15
Tabla 2 Agar de Niven et al. (1981), modificado por Yoshinaga & Frank (1982) ..	16
Tabla 3 Agar Niven et al. (1981), modificado Mavromatis & Quantick (2002)	17
Tabla 4 Agar Niven et al. (1981), modificado por de Guillén et al. (2004)	17
Tabla 5 Composición de agar marino modificado Zobell.....	19
Tabla 6 Caldo de Niven´s, modificado	19
Tabla 7 Agar propuesto por Niven et al. (1981) con modificaciones Mavromatis & Quantick (2002); Guillén et al. (2004).....	33
Tabla 8 Matriz de diagnóstico de identificación de zona de producto expuesto de mayor riesgo	39
Tabla 9 Puntos de muestreos para análisis microbiológicos de superficies.....	42
Tabla 10 Puntos de muestreos para análisis microbiológicos en aire.....	43
Tabla 11 Resultados atípicos en muestras de superficies	49
Tabla 12 Intervalos de tolerancias para bacterias formadoras de histamina en superficies.....	51
Tabla 13 Intervalos de tolerancias para bacterias formadoras de histamina en muestras de aire.....	52

FIGURAS:

Figura 1 Diagrama de proceso para atún precocido congelado, parte 1.....	12
Figura 2 Diagrama de proceso para atún precocido congelado, parte 2.....	13
Figura 3 Colonias positivas con halo color púrpura para bacterias formadoras de histamina.....	16
Figura 4 Zonas de muestreo para programas de vigilancia ambiental.....	29
Figura 5 Ejemplos de zonificación en una banda transportadora.....	30
Figura 6 Diagrama heurístico para plan de vigilancia ambiental.....	36
Figura 7 Identificación de zona de producto expuesto de riesgo.....	40
Figura 8 Diagrama de análisis de bacterias formadoras de histamina en muestras de superficies.....	47
Figura 9 Diagrama para análisis de bacterias formadoras de histamina en muestras de aire.....	48

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue diseñar un programa de vigilancia ambiental para el control de bacterias formadoras de histamina a partir de estándares internacionales, cumpliendo las actividades de acuerdo a la norma mundial de seguridad alimentaria de la asociación de minoristas británicos (BRC, 2018) aplicando criterios de acuerdo a la comisión internacional de especificaciones microbiológicas para alimentos (ICMSF, 2018), Norma de la organización internacional de estandarización (ISO, 2018) número 18593, uso de agar modificado de Niven´s, caldo modificado de Niven´s, reconocimiento de resultados atípicos mediante estadística descriptiva y cálculo de límites de tolerancia que incluye los límites de alerta y acción. La etapa de enfriamiento, acondicionamiento, limpieza y empaque se reconocieron como etapas de producto expuesto de riesgo, donde se centralizo los puntos de muestreos en 4 zonas. Dentro de las 4 zonas se identificaron 28 puntos de muestreo de superficies y 4 puntos de muestreo de aire. De los 28 puntos de muestreo de superficies se encontró resultados atípicos en 7 puntos de muestreo esto representa el 25% de incidencia. Respecto a los resultados microbiológicos de bacterias formadoras de histamina en muestras de aire no se encontró incidencia de resultados atípicos. Se establecieron límites de alerta y acción para el control de bacterias formadoras de histamina en muestras de superficies y aire, siendo de gran aporte al sistema de inocuidad alimentaria.

PALABRAS CLAVE

Agar modificado de Niven´s, caldo modificado de Niven´s, etapa de producto expuesto de riesgo, resultados atípicos, límites de alerta, límites de acción.

ABSTRACT

El The objective of this study was the design of an environmental monitoring programme for the control of histamine-forming bacteria from international standards, complying with the activities in accordance with the British Retailers Association's Global Food Safety Standard (BRC, 2018) applying criteria according to the International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF) , 2018), International Standardization Organization (ISO, 2018) number 18593, use of modified Niven's agar, modified Niven's broth, recognition of outliers using descriptive statistics and calculation of tolerance limits that includes alert and action limits. The cooling, conditioning, cleaning and packaging stage were recognized as exposed risk product stages, where sampling points were centralized in 4 zones. Within the 4 zones, 28 surface sampling points and 4 air sampling points were identified. Of the 28 surface sampling points, outlier results were found at 7 sampling points this represents 25% incidence. Regarding the microbiological results of histamine-forming bacteria in air samples, no incidence of atypical results was found. Alert and action limits were established for the control of histamine-forming bacteria in surface and air samples, being of great contribution to the food safety system.

KEY WORDS

Modified Niven's agar, modified Niven's broth, risk exposed product stage, atypical results, alert limits, action limits

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1.- PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La intoxicación por escombrotóxina o intoxicación por histamina es producida por la ingestión de la histamina; es la enfermedad de transmisión alimentaria más común, por consumo de pescado que no ha cumplido un debido control sanitario. La formación de histamina, está relacionado a pescados que tienen de forma natural altos niveles de histina libre como los escombroides (caballa, atún, bonito), o no escombroides, como el pez espada (Pinillos, Gómez, Elizalde, & Dueñas, 2003).

Los alimentos con concentraciones de histamina superiores a 50 mg por cada 100 g de pescado generalmente se consideran peligrosos (Taylor, Stratton, & Nordlee, 1989). En Europa la concentración de histamina para conservas de atún no debe de exceder 100 mg/kg (Reglamento CE N° 2073, 2015), se ha verificado que en Estados Unidos y Ecuador el límite de histamina es de 5 mg por cada 100 g de pescado (Food and Drug Administration [FDA], 2011; Norma INEN 184, 2013; Norma INEN 1896, 2013; Norma INEN 1772, 2013).

En efecto la intoxicación por histamina puede llegar a ser fatal si no se trata a tiempo, siendo peor para los adultos mayores; las manifestaciones clínicas de la intoxicación por histamina son principalmente neurológicas y cutáneas ejerciendo acción sobre el aparato cardiovascular, glándulas endocrinas y músculo liso (Field-Cortazares & Calderón-Campos, 2008).

Cabe recalcar que Mossalami y Agizy, indicaron que los factores que afectan la producción de histamina son la disponibilidad de histidina libre, la presencia de microorganismos que producen histidina descarboxilasa y las condiciones favorables para el crecimiento de dichos microorganismos (como se citó en Emmanuelle, Yolande, Rose & Henri, 2012). De modo similar Fathi, Pooladgar,

Maghami & Rahman (2013) indican que las condiciones ambientales tales como la temperatura, la tasa de contaminación, la infestación bacteriana de peces, entre otras, influyen en la producción de histamina.

Sobre la intoxicación por escombrotóxina basada en el consumo de alimentos de origen marino, fue una de las enfermedades más predominantes en Estados Unidos en 1998 (Kim et al., 2002). Los microorganismos *Morganella (Proteus) morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Hafnia alvei* fueron aislados de peces incriminados en intoxicación por escombrotóxina (Taylor & Speckhard, 1983).

Por su parte Middlebrooks, Toom, Douglas, Harrison y McDowell aislaron 14 bacterias que tuvieron actividad descarboxilasa, estas bacterias fueron: *Acinetobacter Iwoffii*, *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter spp*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus spp*, *Pseudomonas fluorescens/putida*, *Pseudomonas putregaciens*, *Pseudomonas spp* y *Vibrio alginolyticus* (como se citó en Gingerich, Lorca, Flick, McNair & Pierson, 2001).

En Europa entre enero de 2005 y diciembre de 2010, hubo 246 notificaciones por histamina fuera de los parámetros establecidos (Panel on Biological Hazards [BIOHAZ], 2011). En igual forma el sistema de alerta rápida para alimentos y piensos de Europa, indica que desde 2003 al 2017, hubo 10 casos de productos de la pesca de origen ecuatorial que presentaron niveles de histamina que no cumplieron la regulación europea (Rapid Alert System for Food and Feed [RASSF], 2019).

En efecto la guía de orientación de controles y peligros de los productos pesqueros y piscícolas de la FDA (2011) establece que los pescados que forman histamina y que han sido tratados con calor suficiente para destruir las bacterias que forman histamina, tienen un alto riesgo de un desarrollo posterior de histamina, debido a que tienen la oportunidad de volverse a contaminar por bacterias del entorno.

En consecuencia, las empresas de productos de la pesca que exportan a Estados Unidos y la Unión Europea deben tener implementado un Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control con sus siglas en inglés HACCP (Ragasa, Thornsbury, & Bernsten, 2011).

De acuerdo con De Oliveira, da Cruz, Tavolaro & Corassin (2016) una de las barreras para la correcta implementación del HACCP para la industria de la pesca está relacionada a una difícil e inadecuada educación para los empleados, imprevisibilidad de la disponibilidad y precios de la materia prima, inadecuadas políticas de auditorías, falta de información, conocimiento y exceso de burocracia.

Según la guía para la elaboración del HACCP de la FDA (2018), establece que un peligro es un agente biológico, químico o físico con probabilidad razonable de provocar enfermedades o lesiones si es que no se controla; la histamina se aborda en el análisis de peligros para productos a base de atún, como un peligro químico inherente es decir asociado al atún, por tanto, el control de la histamina entra como un punto crítico de control (PCC).

Las normas de calidad voluntaria suelen provenir de requerimientos del consumidor, cuya necesidad es transmitida por los operadores del mercado (supermercados, proveedores, importadores, entre otros), es decir que se vuelven una exigencia el cumplirlas ya que los clientes solicitan estas certificaciones, según el país donde se exporte, por ejemplo, la norma mundial de seguridad alimentaria de la Asociación de Minoristas Británicos con sus siglas en inglés BRC (Almeida, 2008).

De acuerdo a la norma BRC (2018), establece como uno de sus alcances, “ampliar los requisitos de vigilancia ambiental para reflejar la creciente importancia de esta técnica” (p.2) y se manifiesta en el requisito 4.11.8, donde indica que en las empresas procesadoras de alimentos “deberán existir programas de vigilancia ambiental en función del riesgo de agentes patógenos u organismos de descomposición. Como mínimo, incluirán todas las zonas de producción donde haya productos expuestos y listos para consumir” (p. 39).

La guía de referencia para el HACCP del atún en conserva (National Fisheries Institute [NFI], 2014) indica que el análisis de peligros para la línea de atún precocido congelado tiene siete PCC; el número cuatro es el tiempo acumulado de exposición del atún al ambiente (desde el final de la precocción hasta el inicio de la congelación, para evitar la producción posterior de histamina).

Las empresas procesadoras de atún tienen un elevado riesgo causado por bacterias formadoras de histamina, a nivel mundial no hay referencias de un programa de vigilancia ambiental para el control de las bacterias formadoras de histamina aplicado a empresas procesadoras de atún.

En relación a lo anterior con el objeto de garantizar un proceso adecuado en relación al cumplimiento de las normas establecidas para el efecto, se diseña un programa de vigilancia ambiental para el control de bacterias formadoras de histamina, el cual recopilará estudios ya existentes sobre la temática.

Con estos antecedentes se plantea la siguiente pregunta científica: ¿Cómo se diseña un programa de vigilancia ambiental para bacterias formadoras de histamina, en la línea de atún precocido congelado de la empresa Marbelize S.A.?

1.2.- JUSTIFICACIÓN

En relación a la producción de atún a nivel mundial los datos estadísticos que más se reportan demuestran que en el año 2008 hubo 144 instalaciones de procesamiento de atún en operación que elaboraron productos a base de atún, la capacidad de producción anual estimada fue de 3,05 millones de t; a nivel mundial Ecuador ocupó el segundo lugar en procesar atún, que representó casi el 12% de la producción anual mundial con 362.400 t producidas. En el 2010, hubo aproximadamente 18 plantas procesadoras de atún ubicadas en Guayaquil, Posorja y Manta (Lewis, McCoy, & Campling, 2011).

Ahora bien, en el año 2018 se registraron 49 empresas ecuatorianas certificadas con la norma BRC, de las cuales 13 son empresas procesadoras de atún (BRC,

2019). El presente trabajo contribuirá a la gestión de la seguridad alimentaria en la agroindustria, ya que servirá para el control de bacterias formadoras de histamina que será implementado en la línea de atún precocido y congelado de la empresa Marbelize S.A. Será de utilidad para alcanzar el cumplimiento del requisito 4.11.8 de la Norma BRC (2018), debido a que el estudio está enfocado en el control de microorganismos que descomponen el atún.

Así mismo, aportará en cumplir con lo indicado por la (Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo[SENPLADES], 2017), eje número 2, objetivo número 5, política 5.2 que indica: “Promover la productividad, competitividad y calidad de los productos nacionales, como también la disponibilidad de servicios conexos y otros insumos, para generar valor agregado y procesos de industrialización en los sectores productivos con enfoque a satisfacer la demanda nacional y de exportación” (p. 83).

En relación a la idea anterior este trabajo se orienta a la industria de la pesca y se alinea al plan de desarrollo y ordenamiento territorial de Manabí (PDYOT, 2015), que indica que la maricultura, acuicultura y pesca son la primera cadena de los lineamientos estratégicos de la agenda productiva de Manabí.

Además se va a realizar por primera vez en una empresa ecuatoriana ubicada en la provincia de Manabí, cantón Jaramijó, este programa va a generar conocimiento de los límites de las bacterias formadoras de histamina en el entorno productivo de la línea de atún precocido y congelado de la empresa Marbelize S.A., y será una herramienta importante que ayudará a reforzar la validación de los procedimientos operativos estandarizados de saneamiento (POES) y puntos críticos de control (PCC) del sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control con sus siglas en inglés (HACCP).

1.3.- OBJETIVOS

1.3.1.- OBJETIVO GENERAL

Diseñar un modelo de programa de vigilancia ambiental para el control de bacterias formadoras de histamina a partir de estándares internacionales en la línea de atún precocido congelado de la empresa Marbelize S. A.

1.3.1.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las etapas del proceso donde se aplicará el programa de vigilancia ambiental para el control de bacterias formadoras de histamina.
- Evaluar la presencia de bacterias formadoras de histamina en muestras de superficies y aire en zona de riesgo de producto expuesto.
- Elaborar el programa de vigilancia ambiental para el control de bacterias formadoras de histamina.

1.4.- PREMISA

El diseño del programa de vigilancia ambiental permitirá controlar las bacterias formadoras de histamina en la línea de atún precocido congelado de la empresa Marbelize S.A.

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL

El 04 de enero del 2011 en Estados Unidos de América fue promulgada la ley de modernización de la seguridad alimentaria por sus siglas en inglés (FSMA) esta ley se basa en prevenir los problemas antes de que ocurra, el muestreo es una parte importante de este enfoque preventivo.

Así mismo en el año 2014 FDA, creó un nuevo modelo de muestreo de vigilancia microbiológica diseñado para identificar patrones que pueden ayudar a predecir y prevenir la contaminación futura por bacterias que causan enfermedades. El modelo de muestreo de vigilancia microbiológica está diseñado para identificar patrones que pueden ayudar a predecir y prevenir la contaminación futura por bacterias que causan enfermedades. Los tipos de muestreo que utiliza la FDA se dividen en tres amplias categorías: muestreo ambiental, de productos y de respuesta a emergencias (FDA, 2019).

El programa de vigilancia ambiental ayuda a identificar los sitios problemáticos específicos en las instalaciones, es importante destacar que las agencias reguladoras de todo el mundo requieren cada vez más programas de vigilancia ambiental. Por ejemplo, el departamento de agricultura de los Estados Unidos de América por sus siglas en inglés (USDA) requieren el monitoreo de las superficies en contacto con alimentos en la carne lista para el consumo (Zacharski, Southern, Ryan, & Adley, 2018).

La Norma BRC (2018) en su octava edición, aumentó los requisitos del programa de vigilancia ambiental debido a la importancia que está tomando esta técnica. Las empresas necesitan desarrollar y mantener un programa de vigilancia ambiental, prerequisite crucial bajo la cobertura de un programa de análisis de peligros y puntos críticos de control por sus siglas en inglés (HACCP) (Zacharski et al., 2018).

Para Zacharski et al. (2018), un programa de vigilancia ambiental debidamente establecido actuará como un sistema de alerta temprana de posibles peligros microbianos en una planta de fabricación de alimentos y confirma que los diseños sanitarios, las prácticas del personal y métodos operativos, son eficaces.

El programa de vigilancia ambiental es importante ya que nos provee de datos sobre niveles iniciales y prevalencia de contaminantes microbiológicos en las materias primas y el medio ambiente, está soportado en el muestreo, que se realiza principalmente para investigar datos de referencia y tendencias generales; para obtener información sobre fenómenos como reducción, supervivencia, transferencia y crecimiento de microorganismos en el proceso de producción (Zwietering, Jacxsens, Membré, Nauta y Peterz, 2016).

2.1.1.- UTILIDAD DEL PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL

Las pruebas del producto terminado de manera aislada a menudo son muy poco y demasiado tarde ya que solo detectan el problema; por lo tanto, la mayor atención debe centrarse en la gestión y el control de los peligros de forma más proactiva mediante la implementación de un sistema eficaz de gestión de seguridad alimentaria. Para actividades de verificación en un sistema de gestión de inocuidad de los alimentos, son útiles las pruebas del producto terminado. (Zwietering et al., 2016)

De acuerdo con Jackson (2014), el programa de vigilancia ambiental se utiliza como una verificación de la efectividad de las medidas de control para evitar la entrada, el refugio y la multiplicación de patógenos microbianos en el entorno de producción, específicamente en la:

- Efectividad de los procedimientos de limpieza y saneamiento.
- Efectividad de los controles ambientales:
 - a. Controles asociados con la zonificación higiénica.
 - b. Movimiento de personas, equipos y materiales.

c. Actividades de construcción y mantenimiento.

- Identificación de áreas de ingreso o refugio para que puedan eliminarse.
- Investigación del impacto de los hallazgos adversos.

En fin, un manejo adecuado de la calidad del aire puede mitigar la introducción de microorganismos en toda la corriente de producción de un producto alimenticio, cada instalación de producción de alimentos debe evaluar la presencia de microorganismos en el sitio, muestreando tanto las superficies como el aire, mediante la implementación de un programa de vigilancia ambiental (Masotti, Cattaneo, Stuknyté, & De Noni, 2019).

2.1.2.- REQUISITOS DEL PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL

Es conveniente indicar, que según la Norma BRC (2018) el programa de vigilancia ambiental, tiene que estar orientado a organismos patógenos u organismos de descomposición en función del riesgo y debe ser orientada a las zonas de productos expuestos. El programa de vigilancia ambiental, mínimo debe de tener:

- Un protocolo de muestreo.
- Los puntos donde se tomarán las muestras.
- Las frecuencias de los análisis.
- Los organismos, por ejemplo, agentes patógenos, organismos de descomposición u organismos indicadores.
- Los métodos de análisis.
- El registro y la evaluación de los resultados.
- Límites de control apropiados para el programa de vigilancia ambiental. La empresa deberá documentar las medidas correctivas que deban adoptarse cuando los resultados de la vigilancia indiquen que no se ha cumplido un límite de control o que existe una tendencia al alza de positivos.

En el caso del atún las bacterias más importantes que producen deterioro o descomposición, forman la toxina llamada histamina, durante el deterioro del atún

la histidina libre en el musculo del pescado es convertida en histamina (Lakshmanan, 2000)

2.1.3.- CUANDO SE DEBE DE REVISAR UN PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL

La Norma BRC (2018) indica que las empresas deberán de revisar el programa de vigilancia ambiental, al menos una vez al año y siempre que:

- Haya cambios en las condiciones de proceso, en el flujo del proceso o en los equipos.
- Se produzcan avances en el conocimiento científico.
- El programa no pueda detectar un problema importante, por ejemplo, cuando la autoridad reguladora detecte positivos no detectados por el establecimiento.
- Se detecten productos defectuosos.
- Los resultados sean sistemáticamente negativos.

2.2.- PROCESAMIENTO DEL ATÚN

La mayoría de las instalaciones comerciales de procesamiento de atún se encuentran en regiones tropicales, por lo que alrededor de los cocinadores y áreas para el enfriamiento del pescado tienden a superar los 21°C (DeBeer, Nolte, Lord, & Colley, 2017).

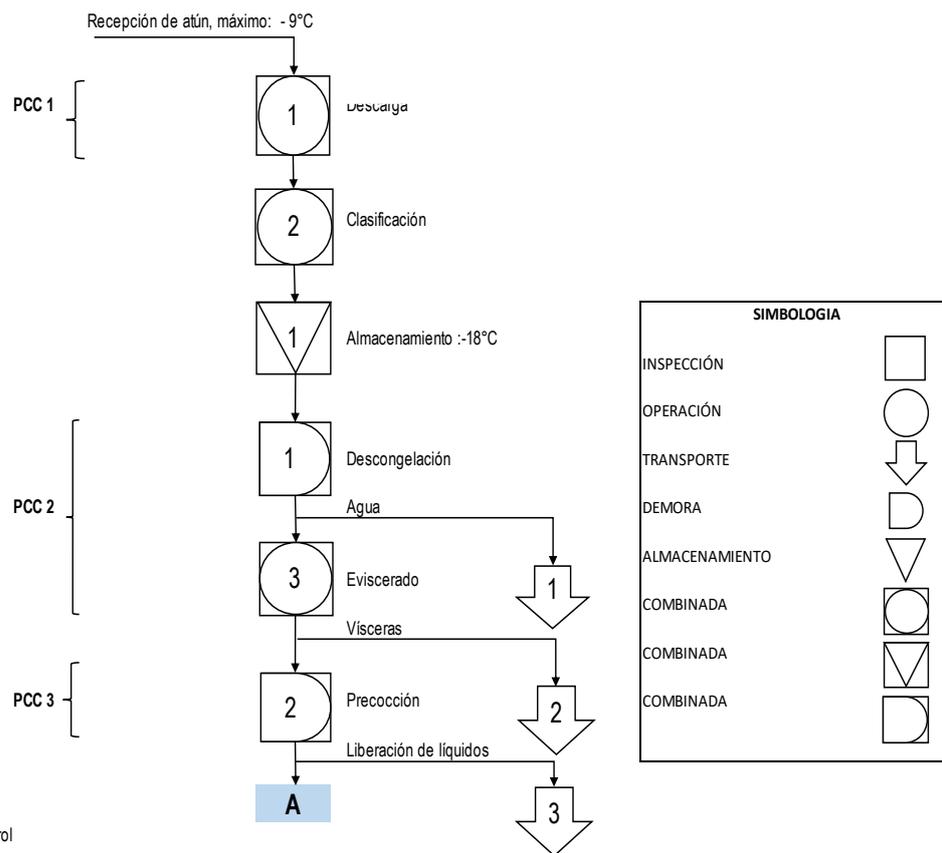
Además, informan que, para prevenir la formación de histamina, todo el proceso debe ser controlado, algunas instalaciones tienen áreas de procesamiento con temperaturas controladas donde la temperatura ambiente se mantiene baja o el producto se puede enfriar en ciertas etapas del proceso, para ayudar a protegerlo del deterioro; sin embargo, incluso con estos controles, en el procesamiento, se dan condiciones que permiten la formación de histamina.

De acuerdo con NFI (2014) indica de manera referencial, que el proceso de una línea de atún precocido y congelado está dividido en diecisiete etapas, que abarca desde la etapa de recepción del atún crudo congelado hasta el embarque de los

lomos de atún precocidos y congelados, como se muestra en Figura 1 y Figura 2 y Figura 2. Los puntos críticos de control, orientados a la prevención de la formación de histamina, son el PCC1, PCC2, PCC3 y PCC4 como se muestra en Figura 1 y Figura 2; los controles van desde el análisis de histamina en la recepción de materia prima, análisis organolépticos, control de tiempo y control de temperatura

Los estudios de zonificación de un programa de vigilancia ambiental consideran el diseño del producto, el flujo del proceso, el diseño de los equipos, la exposición de materias primas y productos antes y después de procesos microbiocidas, movimiento de personas, materiales, equipos y desechos, flujo de aire y servicios, historial previo del tipo de producto e instalación de procesamiento (Jackson, 2014).

Según FDA (2011), hay posibilidad razonable de que el pescado adquiera bacterias formadoras de histamina después de la etapa de precocción, debido a que después de la precocción queda el pescado expuesto al ambiente y a la manipulación. Hay que considerar este riesgo y controlarlo, por tal motivo esta zona de producto expuesto debe tener su programa de vigilancia ambiental enfocado en el control de bacterias formadoras de histamina.



PCC: Punto crítico de control

Figura 1 Diagrama de proceso para atún precocido congelado, parte 1.

Fuente: Adaptado de NFI (2014)

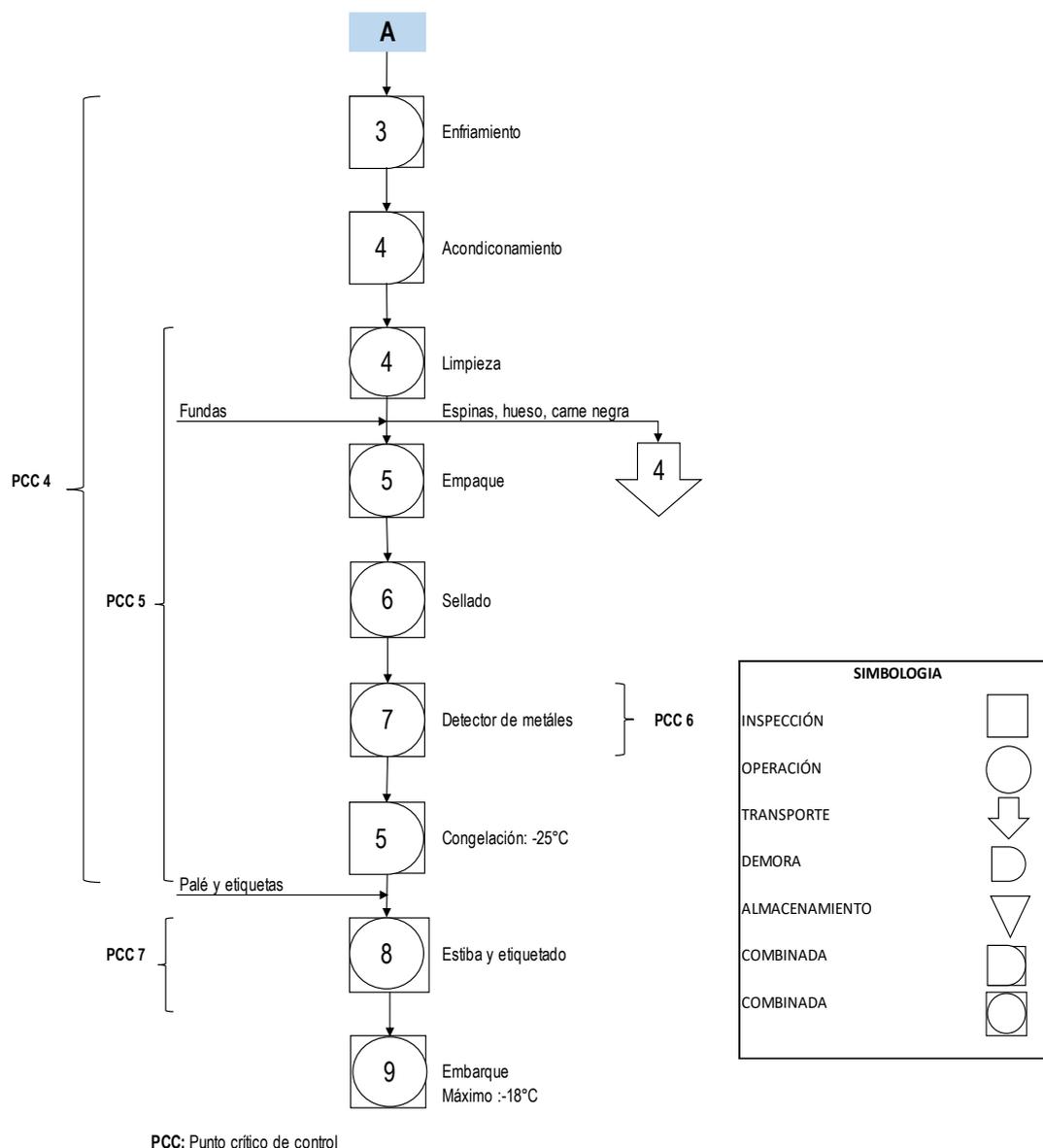


Figura 2 Diagrama de proceso para atún precocido congelado, parte 2

Fuente: Adaptado de NFI (2014).

2.2.1.- BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA

Durante la descomposición de peces como el atún y la caballa, se forma histamina en cantidades significativas debido a la descarboxilación bacteriana de histidina presente en el tejido muscular (Yoshinaga & Frank, 1982). La formación de histamina puede estar relacionada a bacterias grampositivas y gramnegativas (Emborg, 2007). Las cepas de algunas bacterias grampositivas pueden producir histamina y han sido aisladas de alimentos salados, secos y fermentados (Landete, Pardo, & Ferrer, 2006).

De manera similar Emborg (2007) indicó que una amplia gama de bacterias gramnegativas aisladas de mariscos puede producir histamina; sin embargo, solo una pequeña parte de ellas, es capaz de producir histamina en altas concentraciones. Yoshinaga & Frank (1982) encontraron que en condición anaeróbica el *Clostridium perfringens*, bacteria grampositiva, forma grandes cantidades de histamina en el atún.

Taylor & Speckhard (1983) indicaron que las bacterias formadoras de histamina pueden dividirse en dos categorías: las especies capaces de producir grandes cantidades de histamina (mayor a 100 mg/100 mL) y especies capaces de producir cantidades algo menores de histamina (menor a 25 mg/100 mL).

Según Torres, Roeckel, & Martí (2002) la bacteria gramnegativa, *Morganella morganii*, es el microorganismo más histaminogénico del grupo de bacterias formadoras de histamina comúnmente encontrados en el atún. Enache et al. (2013) estudiaron la muerte térmica de cuatro especies de bacterias formadoras de histamina las cuales fueron: *Morganella morganii*, *Raoultella planticola*, *Hafnia alvei* y *Enterobacter aerogenes*, en lomos de atún irradiado e indicaron que *Morganella morganii* fue el microorganismo más resistente a altas temperaturas del grupo de bacterias que se estudió.

Nolte, Black, DeBeer & Enache (2014) desarrollaron un modelo de reducción logarítmica donde la carga microbiológica de *Morganella morganii* sufrió una reducción significativa de cinco logaritmos a temperatura de 60°C en la parte central del atún. Kanki, Yoda, Tsukamoto & Baba (2007) indicaron que la actividad de la enzima histidina descarboxilasa producido por *Morganella morganii* se redujo en un 56% a 50°C y en un 99% a 60°C.

Es necesario indicar que Surya, Alamelu, Priyatharshini, Arisekar, & Sundhar (2019) establecen que un enfriamiento rápido del pescado una vez capturado es necesario para inhibir la formación de la enzima histidina descarboxilasa, se requiere de buenas prácticas higiénicas en cada etapa del procesamiento del pescado

2.2.2.- MEDIOS DE CULTIVOS PARA DETERMINAR BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA

Niven, Jeffrey & Corlett (1981) determinaron un agar para el conteo de bacterias formadoras de histamina, en el estudio usaron dos microorganismos, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*. Los componentes del agar, el número asignado por el chemical abstracts service (CAS) y el porcentaje de cada componente de la fórmula se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1

Composición de agar para análisis de bacterias formadoras de histamina descubierto por Niven et al. (1981).

Componentes	Número CAS	Porcentaje de participación
Triptona.	91079-40-2	0,500
Extracto de levadura.	8013-01-02	0,500
L-histidina 2HCl.	6027-14-5	2,700
Cloruro de sodio (NaCl).	7647-14-5	0,500
Carbonato de Calcio (CaCO ₃).	471-34-1	0,100
Agar.	9002-18-0	2,000
Purpura de Bromocresol.	111-40-2	0,006

Nota. Fuente: Adaptado de Niven et al. (1981)

El medio de cultivo lo ajustaron a un pH de 5,3 y lo esterilizaron en autoclave a 121°C durante 10 minutos con la finalidad de evitar la hidrólisis excesiva del agar. Las diluciones decimales se prepararon utilizando la técnica convencional de vertido en placa, y el agar solidificado se superpuso posteriormente con aproximadamente 5 mL del mismo medio para suprimir las colonias en expansión. Las colonias características formaron un halo de color púrpura. La temperatura de incubación donde obtuvieron mejores resultados fue a 35°C (Niven et al., 1981).

Por su parte Ibrahim, Almayah, & Issa (2017) en su investigación muestran imagen de colonias con la típica coloración de bacterias formadoras de histamina en el agar de Niven's, las cuales presentan un halo color púrpura, como se muestra en Figura 3.

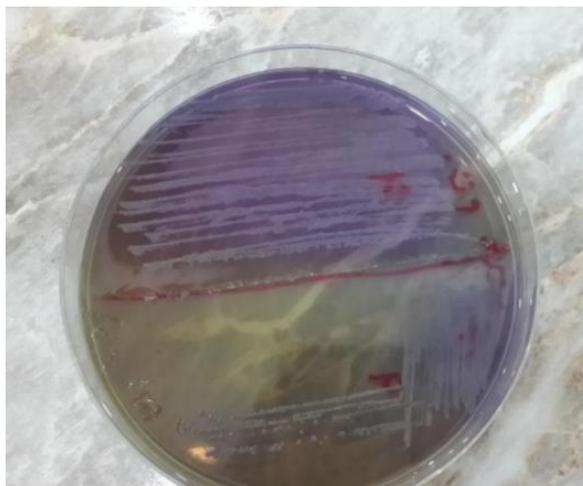


Figura 3 Colonias positivas con halo color purpura para bacterias formadoras de histamina

Fuente: Ibrahim et al. (2017)

Yoshinaga & Frank (1982) realizaron una modificación del medio de cultivo propuesto por Niven et al. (1981). Esta modificación la realizaron ajustando el pH a 6,5 para permitir el crecimiento de *Clostridium perfringens*, sensible al pH ácido, se modificó la concentración de agar e histidina y utilizó otro indicador que es el rojo cresol. Los componentes del agar, el número CAS y el porcentaje de cada componente de la fórmula se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2

Agar de Niven et al. (1981), modificado por Yoshinaga & Frank (1982)

Componentes	Número CAS	Porcentaje de participación
Triptona.	91079-40-2	0,50
Extracto de levadura.	8013-01-02	0,50
L-histidina 2HCl.	6027-02-27	2,00
Cloruro de sodio (NaCl).	7647-14-5	0,50
Carbonato de Calcio (CaCO ₃).	471-34-1	0,10
Agar.	9002-18-0	2,00
Rojo cresol.	1733-12-6	0,02

Nota. Fuente: Adaptado de Yoshinaga & Frank (1982)

Mavromatis & Quantick (2002) realizaron la modificación del medio de cultivo propuesto por Niven et al. (1981). Utilizaron cepas de *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Hafnia alvei*. Esta investigación indica que a pH 5,3 obtuvieron mejores resultados, para evitar la hidrólisis del medio de cultivo después de la esterilización y poder aplicar 121°C durante 15 minutos aumentaron la concentración de agar y recomendaron que el conteo de colonias debe ser máximo 80 colonias por dilución para evitar contar falsos positivos. Los

componentes del agar, el número CAS y el porcentaje de cada componente de la fórmula se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3
Agar Niven et al. (1981), modificado Mavromatis & Quantick (2002)

Componentes.	Número CAS	Porcentaje de participación.
Triptona.	91079-40-2	0,50
Extracto de levadura.	8913-01-02	0,50
L-histidina 2HCl.	6027-02-7	2,70
Cloruro de sodio (NaCl).	7647-14-5	0,50
Carbonato de Calcio (CaCO ₃).	471-34-1	0,10
Agar.	9002-18-0	3,00
Purpura de Bromocresol.	111-40-2	0,02

Nota: Fuente: Adaptado de Mavromatis & Quantick (2002).

Guillén, Ponce, Fárres & Guerrero (2004) realizaron estudios de bacterias formadoras de histamina y modificaron el agar propuesto por Niven et al. (1981). Esta investigación utiliza L-histidina HCl H₂O en una proporción del 2%. En el estudio hubo comprobación de detección de cepas de *Morganella morganii*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia rubidae*, *Hafnia alvei*. Los componentes del agar, el número CAS y el porcentaje de cada componente de la fórmula se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4
Agar Niven et al. (1981), modificado por de Guillén et al. (2004)

Componentes	Número CAS	Porcentaje de participación
Triptona.	91079-40-2	0,5
Extracto de levadura.	8013-01-02	0,5
L-histidina HCl H ₂ O.	5934-29-2	2,0
Cloruro de sodio (NaCl).	7647-14-5	0,5
Carbonato de Calcio (CaCO ₃).	471-34-1	0,1
Agar.	9002-18-0	2,0
Purpura de Bromocresol.	111-40-2	1,0 (0,6% en etanol al 95%)

Nota. Fuente: Adaptado de Guillén et al. (2004)

Bjornsdottir, Bolton, McClellan, Jaykus & Green (2009) indicaron que el medio propuesto por Niven et al. (1981), una vez inoculada la muestra e incubada el medio de cultivo produce acumulación de histamina durante el crecimiento por bacterias y provoca un aumento del pH, que induce a un cambio de color, lo que permite la visualización de colonias bacterianas positivas. Este método es relativamente fácil de uso y barato.

Sin embargo, algunos investigadores indican que que el medio propuesto por Niven et al. (1981), presenta incidencia falsos negativos, otros presentan falsos positivos ya que las reacciones químicas que dan el viraje del halo color purpura también se deben a la formación de otros compuestos alcalinos (no histamínicos), para reducir los falsos positivos se han realizado varias modificaciones al medio de cultivo manipulando el pH, el tiempo y temperatura de incubación tal como lo hizo Mavromatis & Quantick, 2002 (Bjornsdottir et al., 2009).

De la misma forma Actis, Smoot, Barancin, & Findlay (1999), indicaron que el alto número de resultados falsos positivos en el agar Niven's para determinar bacterias formadoras de histamina se debe a sustancias alcalinas como el amoníaco o compuestos relacionados, en cambio para Economou, Papadopoulou, Levidiotou, Brett, & Seferiadis (2006) no coinciden con la teoría de que los productos alcalinos de la degradación de sustancias distintas de la histidina son responsables de los resultados falsos positivos, quizás una ruta metabólica diferente que implique la degradación de histidina pero no la producción de histamina es responsable de este fenómeno

Bjornsdottir et al. (2009) realizaron comparaciones de tres métodos de análisis para bacterias formadoras de histamina usando el agar propuesto por Niven et al. (1981) método potenciómetro y técnica de reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés (PCR), de 152 cepas bacterianas analizadas, 128 (84%) fueron positivos con el método de agar, 73 (48%) fueron positivos con la técnica potenciométrica y 74 (49%) fueron positivos con el ensayo de PCR. En general, se observó una tasa de diferencia del 38% con relación a la técnica potenciométrica y PCR, debido a que el método de agar detecto cepas de baja y alta formación de histamina.

Devivilla, Stephen, Lekshmi, Kumar & Nayak (2019), realizaron propuesta de agar marino modificado Zobell y compararon con el agar propuesto por Niven et al. (1981) pero modificado por Yoshinaga & Frank (1982), la conclusión fue que el agar marino modificado Zobell podría usarse habitualmente para el aislamiento de bacterias formadoras de histamina de pescado fresco. El pH a controlar en el medio de cultivo es 6.5 ± 0.2 . Al ser una nueva propuesta de medio de cultivo

nuevo, aún no ha sido comparada con otras técnicas modernas como PCR. Los componentes del agar, el número CAS y el porcentaje de cada componente de la fórmula se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5
Composición de agar marino modificado Zobell

Componentes	Número CAS	Cantidad g/L
Peptona	92079-38-8	5,0000
Extracto de levadura	8913-01-02	1,0000
Citrato férrico	2338-05-8	0,1000
Cloruro de Sodio	7647-14-5	19,4500
Cloruro de magnesio	7786-30-3	8,8000
Sulfato de sodio	7757-82-6	3,2400
Cloruro de calcio	10043-52-4	1,800
Cloruro de potasio	7447-40-7	0,5500
Bicarbonato de sodio	144-55-8	0,1600
Bromuro de potasio	7758-02-3	0,0800
Cloruro de estroncio	10476-85-4	0,0340
Ácido bórico	10043-35-3	0,0220
Silicato de sodio	1344-09-8	0,0040
Fluorato de sodio	-	0,0024
Nitrato de amonio	6484-52-2	0,0016
Fosfato disódico	7558-79-4	0,0080
L-histidina HCl H ₂ O.	5934-29-2	5,0000
Azul de bromo timol	76-59-5	0,4000
Agar	9002-18-0	15,0000

Nota. Fuente: Adaptado de Devivilla et al. (2019)

2.2.3.- PRUEBA DE CONFIRMACIÓN PARA BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA EN EL MEDIO MODIFICADO DE NIVEN´S

Moreira (2018) realizó análisis de bacterias formadoras de histamina y para confirmar las colonias presuntivas positivas aisladas en el agar modificado de Niven´s, inoculó estas colonias que presentaron halo color púrpura en tubos que contenían caldo modificado de Niven´s, con un tubo invertido de Durham, los componentes del medio cultivo, el número CAS y el porcentaje de cada componente de la fórmula se detalla en la Tabla 6.

Tabla 6
Caldo de Niven´s, modificado

Componentes	Número CAS	Porcentaje de participación
Triptona.	91079-40-2	0,50
Extracto de levadura.	8013-01-02	0,50
L-histidina HCl H ₂ O.	5934-29-2	2,70
Cloruro de sodio (NaCl).	7647-14-5	0,50

Nota. Fuente: Adaptado de Moreira, (2018)

Se considera la prueba positiva si en los tubos invertidos Durham hay presencia de gas y el medio se torna de color purpura. Una vez confirmado las colonias positivas se procede a realizar los cálculos de los resultados de acuerdo a la fórmula [3] indicada en el Anexo 1.

2.2.4.- LÍMITES DE ACEPTACIÓN MICROBIOLÓGICOS EN AMBIENTES

Corpas (2009) propuso establecer intervalos de tolerancia para la toma de acciones preventivas y correctivas, para ello elaboró un procedimiento que soporta la interpretación de los reportes correspondientes a muestras de ambientes, superficies de contactos, equipos, utensilios y manos de operarios, como herramienta de discernimiento para la toma de decisiones, entorno a los parámetros medibles que a futuro se encuentren fuera de los intervalos definidos como normales.

Según Corpas (2009); Bottale & Riera (2016) indicaron que primero se debe de establecer medidas de tendencia central y dispersión de los resultados de los análisis: promedio y desviación estándar, las cuales son indispensables para poder establecer los límites de alerta y acción, según se la Fórmula 1.

$$\bar{X} \pm ks. \quad [1]$$

Donde:

\bar{X} = Media muestral.

k = Constante que tiene en cuenta el número de muestra y el nivel de confiabilidad,

estás constantes se ven reflejada en el Anexo 2

s = Desviación estándar.

A diferencia de Iguarán, Carmona, Betancur & Gonzáles (2011); Iguarán (2012) que indican que después de la obtención de los resultados, primero se debe

eliminar los datos atípicos, cuya inclusión podría derivar en la desviación de los valores de tendencia central y dispersión. Los datos atípicos reflejan la necesidad de monitoreos constantes. Se consideraron atípicos, aquellos que cumplen con la Fórmula 2.

$$\frac{X - \text{med}(x_j)}{\text{MEDA}(x_j)} > 4,5 \quad [2]$$

Donde:

X, es el resultado individual de cada análisis.

med (xi), es la mediana de las observaciones.

MEDA (xj), es la mediana de las desviaciones absolutas con respecto a la mediana.

2.3.- PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL PARA BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA

Según Emborg (2007), las bacterias formadoras de histamina son parte de la microflora natural del pescado fresco y cruzan de contaminación durante la manipulación a bordo de buques pesqueros, particularmente por destripamiento, limpieza y muy probable durante el procesamiento. Sin embargo, para las bacterias formadoras de histamina hay poca información disponible sobre las rutas de contaminación durante procesamiento el procesamiento del pescado.

Gingerich et al (2001) realizaron análisis de bacterias formadoras de histamina en superficies de contacto de barcos y empresas procesadoras de pesca fresca y congelada, los resultados de esta investigación indicaron que la aparición de bacterias formadoras de histamina en las instalaciones de procesamiento de pescado fue muy baja.

Hwang, Kung, Lin, Hwang & Tsai (2011) en Taiwán realizaron muestreos de superficies del ambiente de procesamiento y pescado procedentes de empresas de procesamiento de pesca fresca y congelada, consideraron una empresa

certificada con HACCP y dos empresas no certificadas con HACCP; de acuerdo al muestreo realizado no encontraron bacterias formadoras de histamina en las superficies de la empresa certificada con HACCP, adicional indican que las buenas condiciones de limpieza y los puntos críticos de control ayudan a eliminar o reducir la presencia de bacterias formadoras de histamina.

Zoellner et al. (2018); Zacharski et al. (2018); Simmons & Wiedmann (2018) establecen referencias para programas de vigilancia ambiental, el objetivo del programa de vigilancia ambiental que plantearon en sus investigaciones fue el control del microorganismo patógeno *Listeria monocytogenes*.

La empresa 3M Food Safety (2019) frente a la necesidad de las exigencias del monitoreo ambiental como una estrategia clave de verificación de seguridad alimentaria, y los programas de certificación de seguridad alimentaria de terceros reconocidos a nivel mundial, crea un manual de monitoreo ambiental que está disponible para su descarga gratuita, como un documento completo de más de cien páginas, proporcionando una perspectiva holística sobre este enfoque preventivo para la seguridad alimentaria. Esta guía fue elaborada con expertos de la empresa 3M en conjunto con expertos de la Universidad de Cornell, la cual tiene referencias de programa de vigilancia ambiental para microorganismos patógenos, microorganismos indicadores de higiene y microorganismos de descomposición.

El manual de monitoreo ambiental para la industria de alimentos y bebidas desarrollado por la empresa 3M Food Safety (2019) y la Universidad de Cornell en el capítulo 5 da referencia de como desarrollar un programa de vigilancia ambiental para microorganismos de descomposición. Dentro de los microorganismos de descomposición considera a los mohos y levaduras, contaje de aerobios, bacterias ácido lácticas. El capítulo 5 relacionado a los microorganismos de descomposición fue desarrollado por Worobo, Snyder, & Lingle (2019) considerando los aspectos claves del programa, las cuales son: selección del microorganismos de descomposición, identificación de puntos de muestreos, la frecuencia del analisis, número de analisis, determinación de los niveles de aceptación.

Al día 08 de marzo del 2020 en Ecuador no hay publicaciones relacionadas a programas de vigilancia ambiental direccionado al control de bacterias formadoras de histamina.

2.4.- UNIDAD DE ANÁLISIS

La unidad de análisis es la empresa Marbelize S.A., línea de atún precocido congelado, el producto elaborado en esta línea se exporta a otras empresas que lo usarán como materia prima para elaborar conservas de atún, la línea de proceso cuenta con etapas que cumplen con lo descrito en la Figura 1 y Figura 2, las cuales se describen a continuación.

- **Descarga:** Los túnidos provienen de barcos que cumplen con la regulación sanitaria requerida por la subsecretaria de calidad e inocuidad y con la regulación de origen de la pesca controlada por la subsecretaria de recursos pesqueros (SRP). En esta etapa está definido un punto crítico de control para el control de histamina. El resultado máximo es 1,7 mg / 100g. La temperatura a la cual llega a la planta la materia prima es a -9°C.
- **Clasificación:** En esta etapa hay operarios realizando una clasificación del atún por peso y especie. Las especies que más se captura en el océano pacífico oriental son *Katsuwonus pelamis*, *Thunnus albacares*, *Thunnus obesus*. Las tallas se clasifican en: -3, 3 - 4, 4 - 5, 5 - 7, 7 - 10, 10 - 12, 12 - 16, 16 - 20, 20 - 30, 30 - 40, 40 - 60, 60 - 80, 80 - 100 y +100 libras. El pescado es colocado en tinas de acuerdo a su clasificación e ingresado en un inventario.
- **Almacenamiento en congelación:** El producto en tinas es almacenado en una cámara frigorífica a una temperatura de -18°C.

- **Descongelación:** De acuerdo a la planificación de la producción se envía tinas al proceso de descongelación, en este proceso se controla tiempo y temperatura. Los tiempos varían en función de la talla de pescado.
- **Eviscerado:** En esta etapa se sacan las vísceras del atún, en este proceso se controla tiempo y temperatura. Los tiempos varían en función de la talla de pescado. El pescado eviscerado se orden en coches según la especie y tallas. Hay un punto crítico de control de tiempo acumulado desde inicio del descongelamiento hasta inicio de cocción que es de 12 horas y máximo 4°C.
- **Precocción:** El pescado se ingresa en cocinadores de vapor, los programas de precocción varían en función de las tallas de pescado. En esta etapa al final de la precocción se asegura la eliminación del microorganismo *Morganella morganii* que es la bacteria más resistente que forma histamina en ambientes expuestos. La temperatura mínima debe de ser 60°C al centro del pescado. En esta etapa el control de temperatura es un punto crítico de control, al final de la precocción la temperatura debe de ser mínimo 60°C.
- **Enfriamiento:** Una vez finalizada la precocción los coches de atún ingresan a un área de enfriamiento donde el atún recibe ducha de agua a temperatura ambiente. El tiempo varía de acuerdo a la talla, se controla tiempo y temperatura.
- **Acondicionamiento:** Los coches con pescado ingresan a un cuarto donde está el agua atomizada en pequeñas partículas y a una temperatura de 10°C. El tiempo varía de acuerdo a la talla del pescado, se controla tiempo no exceda de 6 horas y temperatura menor a 25°C.
- **Limpieza:** Los coches de atún los distribuyen por mesas, en cada mesa hay un aproxima de 60 personas, cada persona extrae la piel, espinas y carne negra del atún para dejar el lomo limpio, se controla tiempo y temperatura.

- **Empaque:** Los lomos se empaacan en fundas de 7 a 10 Kilos y se controla tiempo y temperatura.
- **Sellado de fundas:** Las fundas se sellan al vacío y se controla tiempo y temperatura.
- **Detector de metales:** Las fundas selladas pasan por equipo detector de metales, funda que presenta alguna incidencia de contaminación es rechazada por un brazo neumático que se activa cuando el equipo detecta la presencia de una partícula. La verificación de la funcionalidad del equipo es un punto crítico de control y el control se realiza con la verificación de unos patrones certificados, también se controla tiempo y temperatura.
- **Congelación:** Las fundas con los lomos de atún son ingresadas en unos cuartos de congelación donde la temperatura del área es de -25°C a 30°C. El producto ha cumplido su congelación cuando llega a -18°C.

Hay dos puntos críticos de control relacionados a tiempos acumulados y temperatura al llegar el producto a 0°C. Un tiempo es el tiempo acumulado desde que el producto sale de cocción hasta que llegue a 0°C, el tiempo no debe de exceder las 12 horas, este punto crítico de control está diseñado para el control de histamina y el otro tiempo se empieza a contabilizar desde que la persona toca el pescado hasta su congelación a 0°C, este tiempo no debe de exceder las 3 horas. Este tiempo se aplica si en algún momento el producto estuvo expuesto a temperaturas mayores a 21° C.

- **Paletizado-etiquetado:** una vez que se verificar que el producto llego a -18°C, el producto es colocado en palé que cumple condiciones sanitarias, se colocan un aproximado de 180 lonjas por palé. Se identifica cada palé, la declaración de alérgeno (Contiene pescado) en cada palé es considerado un punto crítico de control.

- **Embarque:** el producto ubicado en palé es ubicado en una cámara a -18°C hasta que se decida su exportación, cumpliendo las fechas de embarque en función de lo acordado con el cliente.

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1.- UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El desarrollo de esta investigación se realizó en la línea de atún precocido y congelado de la empresa Marbelize S.A. ubicada en el cantón Jaramijo, en las coordenadas 0°58'22"S y 80°39'01"O.

Los análisis microbiológicos de bacterias formadoras de histamina se realizaron en el laboratorio de microbiología de la empresa Marbelize S.A. ubicada en el cantón Jaramijo, en las coordenadas 0°58'22"S y 80°39'01"O.

3.2.- DURACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación experimental se realizó desde noviembre del 2019 hasta abril del 2020, con una duración de 6 meses.

3.3.- MÉTODOS Y TÉCNICAS

- **Bibliográfico:** Este trabajo de investigación permitió realizar la recopilación de evidencia científica a partir de artículos científicos indexados y de diversas fuentes como son: el internet, normas, libros, consultas a personal con experiencia en microbiología.
- **Laboratorio:** Los análisis microbiológicos de las bacterias formadoras de histamina se realizaron en el laboratorio de microbiología de la empresa Marbelize S.A.

3.4.- VARIABLES EN ESTUDIO

3.4.1.- VARIABLE INDEPENDIENTE

La variable independiente es la línea de atún precocido y congelado de la empresa Marbelize S.A., cuyas etapas de proceso se ajustan en lo descrito en el numeral 2.4.- UNIDAD DE Unidad de análisis

3.4.2.- VARIABLE DEPENDIENTE

La variable dependiente es el programa de vigilancia ambiental de bacterias formadoras de histamina, los componentes de un programa de vigilancia ambiental están descritos en el numeral 2.1.- PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL.1.2.- JUSTIFICACIÓN

3.5.- PROCEDIMIENTOS

El programa de vigilancia ambiental se estructuró en función de los siguientes puntos:

3.5.1.- IDENTIFICACIÓN DE ZONA DE PRODUCTO EXPUESTO

La (International Commission on Microbiological Specifications for Foods [ICMSF], 2018) y la norma BRC (2018) estableció que en los alimentos que favorezcan el desarrollo de microorganismos y que hayan sido tratados por calor, se debe prestar atención a las zonas después de un proceso térmico que elimine patógenos, donde los productos están expuestos sin protección (ni envasados, ni encerrados en depósitos, tuberías u otros), a temperaturas ambiente de alto riesgo por encima de 4.4°C, la referencia de esta temperatura máxima para productos de la pesca que es considerada de refrigeración está indicada por FDA (2011) . Para la identificación de la zona de producto expuesto de riesgo se consideró los criterios anteriormente expuestos y las etapas de proceso indicadas en los diagramas que se detallaron en Figura 1 y Figura 2.

3.5.2.- IDENTIFICACIÓN DE ZONAS DE MUESTREO

Para la selección de los sitios de muestreo se comenzó con un mapeo para dar una visión general de las áreas de producción que implicó una división de la instalación en varias áreas (zonas) basadas en el riesgo microbiano para el producto tomando el criterio del ICMSF (2018), realizó la categorización de 4 zonas de muestreo en función del riesgo y se distribuyen de acuerdo a la Figura 4.

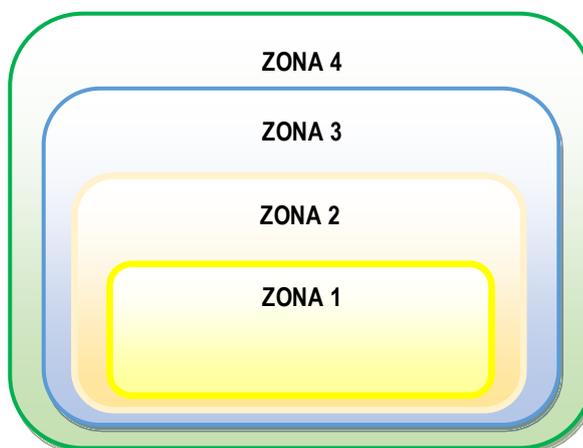


Figura 4 Zonas de muestreo para programas de vigilancia ambiental.

Fuente: ICMSF (2018)

- **Zona 1:** Áreas de la empresa que son superficies de contacto directo con el alimento, después del paso de cocción o reducción microbiana y antes de que el producto sea sellado, por ejemplo, guantes, bandejas, manos, mesas.
- **Zona 2:** Áreas en la empresa donde no haya contacto directo con el producto y estén cercanas a superficies de contacto de la zona 1, por ejemplo, botoneras, coches para colocar bandejas con pescado.
- **Zona 3:** Superficies que no tengan contacto con el producto y que no estén dentro de las inmediaciones de la zona 2. Las superficies de la zona 3, tienen

la posibilidad de conducir contaminación cruzada al producto, por ejemplo, paredes, pisos, alcantarillas, zócalos, utensilios de limpieza, botas.

- **Zona 4:** Zonas alejadas de las áreas de procesamiento, fuera de la zona 3. Las áreas de la zona 4, por ejemplo, otras áreas de proceso totalmente separadas de la zona 1, zona 2 y zona 3.

Stevens & Hood (2019) detallaron un ejemplo de zonificación microbiológica basado en el nivel de riesgo de acuerdo a lo establecido por la ICMSF, como se muestra en la Figura 5.

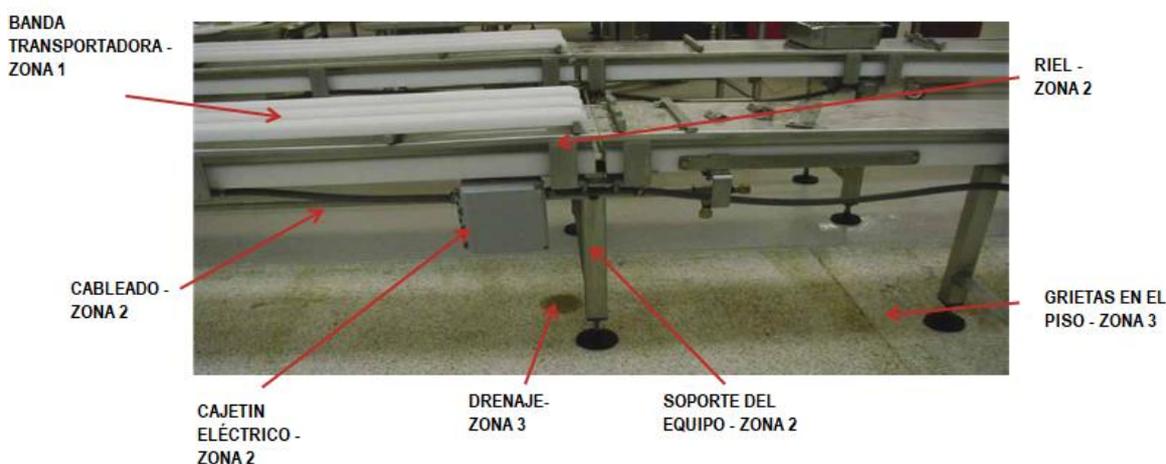


Figura 5 Ejemplos de zonificación en una banda transportadora.
Fuente: Stevens & Hood (2019)

En esta investigación se realizó la separación de las zonas de riesgo en función de lo indicado por ICMSF (2018).

3.5.3.- PUNTOS DE TOMA DE MUESTRAS

La identificación de los puntos de muestreo en superficies se realizó en función de la norma de métodos horizontales para la toma de muestras en superficies, cuyo número es 18593, perteneciente a la organización internacional de normalización por sus siglas en inglés ISO (2018).

La norma ISO 18593:2018 ofrece una relación no exhaustiva de ubicaciones potenciales de los puntos de toma de muestras que se consideraron en esta investigación

- **Superficies que no entran en contacto con alimentos:** desagües, suelos, encharcamientos en el suelo, equipos de pesaje de suelo, cintas transportadoras, montacargas, carretillas, carros, máquinas de hielo, delantales, paredes.
- **Superficies que entran en contacto con alimentos:** cintas transportadoras, rebanadoras, tablas de corte, cortadoras, depósitos, trituradoras, mezcladoras, peladoras, máquinas de ensamblaje, equipamiento de llenado y envasado, contenedores, guantes y manos.

Para el caso de las muestras de aire se escogieron dos grupos de muestras, el primer grupo que se identifica como zona 1, zona 2 y zona 3 debido a que comparten la misma calidad de aire y se encuentran dentro de la sala de proceso de lomos precocidos congelados, y el segundo grupo de muestra que corresponde a zonas fuera de la sala de proceso de lomos precocidos congelados y que corresponden a la zona 4.

También se consideró lo indicado por Delgado, Escamilla, Pérez & Arias (2004) el método no probalístico denominado “muestreo por juicio” o de “expertos”; en este método la persona más capaz en el tema de estudio selecciono las muestras (individuos y número) que consideró más representativo de la población de estudio. Para esta investigación se contó con la colaboración del jefe de laboratorio de microbiología de la empresa Marbelize el Blgo. David Sierra Zambrano.

3.5.4.- PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS

El muestreo de superficies se realizó en función de la norma ISO 18593:2018. Métodos horizontales para la toma de muestras en superficies, según Anexo 1.

Para el caso de muestras de aire, se usó equipo muestreador de aire **MAS 100 (Merck)**. Equipos muestreadores de aire han sido utilizados en las investigaciones para poder determinar cargas microbiológicas en ambientes tales investigaciones han sido realizadas por Engelhart, Glasmacher, Simon, & Exner (2007); Bottale & Riera (2016), también se denomina método activo debido a que es un procedimiento volumétrico por impacto sobre placa con agar. El equipo **MAS 100 (Merck)**, viene configurado con un caudal de aspiración de 100 L/min y una velocidad de impacto inferior a 10,8 m/s. Para el caso de esta investigación se configuró en el equipo un volumen de muestreo de aire de 100 litros, debido a que 1000 litros de aire saturaron las placas que hizo difícil el conteo y aislamientos de los microorganismos.

Dentro del equipo se colocó una placa petri de 90 mm de diámetro que contenía un aproximado de 15 mL de agar modificado de Niven's que previamente estaba estéril y en estado sólido. Una vez que se recolectó la muestra se llevó al laboratorio de microbiología y se realizó la incubación a 35°C por 48 horas, se realizó el conteo de las colonias que presentan un halo color púrpura consideradas presuntivas, cada colonia presuntiva fue inoculada en un tubo de ensayo que contenía el caldo modificado de Niven's y un tubo de fermentación Durham, se procedió a la incubación por 24 horas a 35°C y se consideró positivo aquel tubo que presentaba el contenido color púrpura, con formación de gas, los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias (UFC) en 100 litros de aire, es decir UFC/ 100 L.

3.5.5.- FRECUENCIA DE ANÁLISIS

La ICMSF (2018), establece que el número de muestras y la frecuencia de muestreo normalmente están determinadas por el conocimiento del proceso y su variabilidad, pero indica de forma referencial que el muestreo se puede realizar una vez por semana. Esta investigación se acogió a la referencia de un muestreo mínimo por semana.

3.5.6.- MÉTODO DE ANÁLISIS PARA BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA

Se realizó la preparación del medio para bacterias formadoras de histamina modificando el medio propuesto por Niven et al. (1981). La modificación consistió en aumentar la concentración de agar para evitar la hidrólisis del agar en el proceso de esterilización, esto fue propuesto por Mavromatis & Quantick (2002) y se reemplazó el aminoácido L-histidina 2HCl por L-histidina HCl H₂O, esta modificación se realizó por Guillén et al. (2004) Esta última modificación se consideró en esta investigación debido a que se realizó las consultas a empresas que venden reactivos marca Merck y Sigma Aldrich e indicaron que descontinuaron la producción de L-histidina 2HCl. Se escogió este agar debido a que el producto se encuentra en condiciones aeróbicas en la zona de producto expuesto. Aplicando las dos modificaciones indicadas anteriormente, la composición del medio de cultivo quedó de acuerdo a lo indicado en la Tabla 7.

Tabla 7

Agar propuesto por Niven et al. (1981) con modificaciones Mavromatis & Quantick (2002); Guillén et al. (2004)

Componentes	Número CAS	Porcentaje de participación
Triptona.	91079-40-2	0,5
Extracto de levadura.	8913-01-02	0,5
L-histidina HCl H ₂ O.	5934-29-2	2,0
Cloruro de sodio (NaCl).	7647-14-5	0,5
Carbonato de Calcio (CaCO ₃).	471-34-1	0,1
Agar.	9002-18-0	3,0
Purpura de Bromocresol.	111-40-2	0,02

Nota. Fuente: Adaptado de Mavromatis & Quantick (2002); Guillén et al. (2004)

Para preparar el medio de cultivo se disolvieron todos los ingredientes de acuerdo a la cantidad de agar que se requería preparar en función de las muestras analizadas, una vez diluido los componentes se realizó ajuste del pH a 5,3 este ajuste se lo realizó con hidróxido de sodio uno molar. Una vez ajustado el pH, se esterilizo en la autoclave a 121°C por 15 minutos. Se mantuvo el agar en baño maria a 45°C para que no se solidifique.

Para el caso de las muestras de superficies las diluciones decimales se prepararon desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁵ y se colocó 1 mL de estas diluciones en una caja petri estéril, se agregó 10 mL del agar modificado de Niven´s y se dejó solidificar

el agar, posterior se adicionó 5 mL del mismo medio que suprimieron las colonias en expansión y por segunda vez se dejó solidificar el agar, las placas con el agar solidificado se colocaron en incubación a 35°C por 48 horas. Las colonias de las bacterias formadoras de histamina presentaron un halo de color púrpura, se consideró el conteo que presentó un máximo de 80 colonias por dilución que evitó contar falsos positivos presuntivos. Para el caso de método de siembra de muestras de aire se procedió de acuerdo a 3.5.4

El conteo de cada colonia positiva en el agar modificado de Niven's se consideraron presuntivas, cada colonia aislada se confirmó con el caldo modificado de Niven's de acuerdo a lo indicado en 2.2.3 Prueba de confirmación

3.5.6.- LÍMITES DE CONTROL APROPIADOS PARA EL PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL

Para el cálculo de los límites de control y límites de acción se aplicó el procedimiento indicado por Corpas (2009); Iguarán et al. (2011); Iguarán (2012), para el cual se realizó el siguiente procedimiento:

Escoger 10 resultados de análisis microbiológicos de superficies y de aire, según el plan de muestreo. Los pasos que se siguieron se detallan a continuación:

Se organizó los datos en un cuadro, de manera que se convirtió en la matriz que alimenta el procesamiento estadístico de los datos.

Se estableció las medidas de tendencia central y dispersión: promedio y desviación estándar, las cuales son indispensables para establecer los límites de alerta y acción.

$$\frac{X-med(xj)}{MEDA(xj)} > 4,5$$

Se eliminó los datos atípicos, de acuerdo a la fórmula
[.

Se aplico la fórmula $\bar{X} \pm ks$.
[y se estableció los límites de alerta y acción para los puntos de muestreo.

Se busco el valor de la constante k, y para ello se utilizó los valores de la tabla estadística de factores de tolerancia para distribuciones normales, se tomó en cuenta el número de muestras y el nivel de confianza (Walpole, Myers, Myers, & Ye, 2012) el cuál fue al 95% para el límite de alerta y al 99% para el límite de acción. Los valores de la constante k, están en el Anexo 2, para este estudio se consideró el valor para 10 y 11 muestras.

Se organizó los datos de límites de alerta y acción en una tabla, de manera que constituya el soporte guía para la empresa en la interpretación de los resultados microbiológicos. Los resultados fueron reportados y analizados utilizando software microsoft excel 2013.

3.5.7.- DIAGRAMA DE HEURÍSTICO PARA LA ELABORACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

El diseño de plan de vigilancia ambiental siguió diagrama heurístico elaborado de acuerdo a lo indicado desde el literal 3.5.1. Identificación de producto expuesto hasta el literal 3.5.6 Límites de control apropiados para el programa de vigilancia ambiental, como se muestra en la Figura 6.

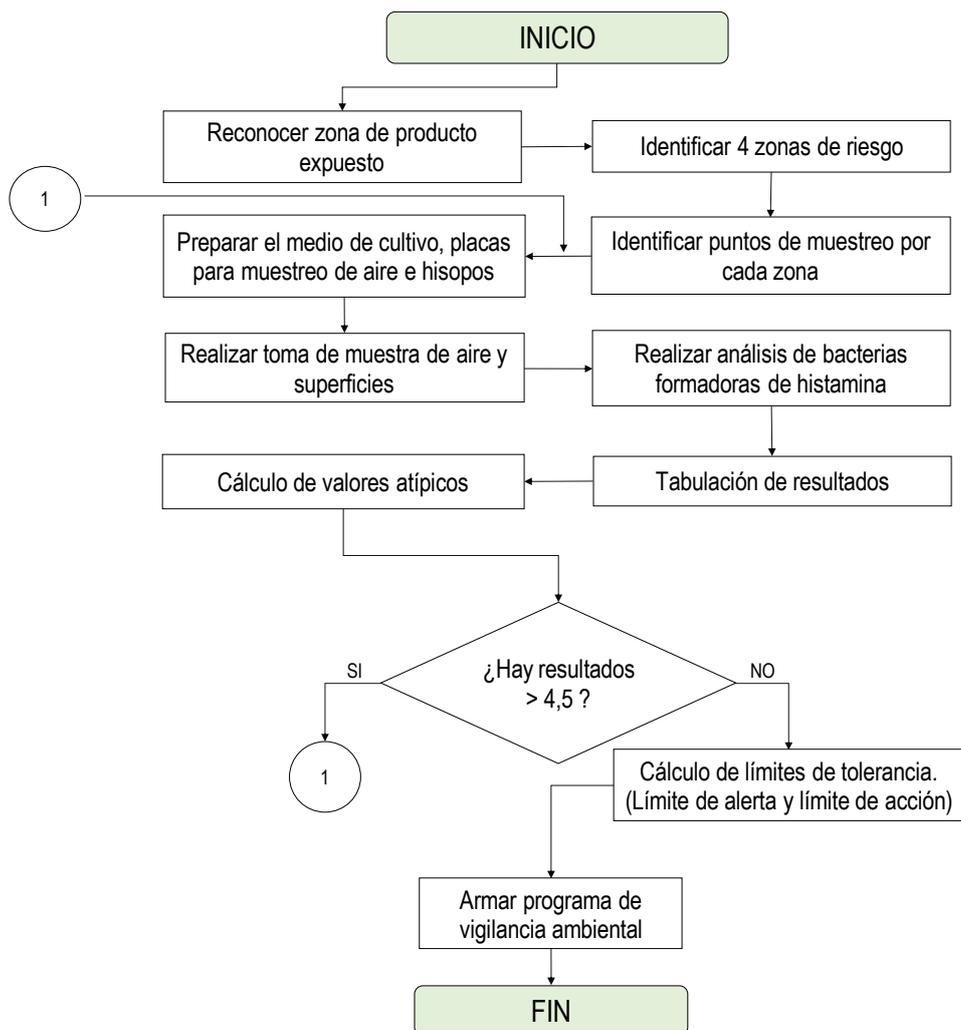


Figura 6 Diagrama heurístico para plan de vigilancia ambiental

Fuente: Autor de la investigación.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- ETAPAS DEL PROCESO DONDE SE APLICA EL PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL

La norma BRC (2018) establece que como mínimo el programa de vigilancia ambiental debe de abarcar las etapas de producto expuesto. La importancia del riesgo de contaminación microbiológica dependerá de las propiedades intrínsecas del producto en favorecer el desarrollo o la supervivencia de agentes patógenos. El ICMSF (2018) indica que los alimentos que están pasteurizados, cocinados o sujetos a otros procesos que reducen los patógenos pueden contaminarse cuando se exponen al medio ambiente, antes de su llenado o envasado. Los fabricantes de tales alimentos deben tomar todas las precauciones razonables que evite la contaminación después de que el alimento esté cocido y antes de ser empacado, pero es imposible evitar por completo. que los alimentos puedan adquirir microbiota del entorno de procesamiento.

El NIF (2014) establece que debido a la condición razonable de posible formación de histamina en el proceso del atún, después de la etapa de precocción hace énfasis en la importancia del control del tiempo acumulado de exposición del atún que abarca las etapas de proceso, después de la precocción del atún hasta llegar a la temperatura de refrigeración, el tiempo indicado es máximo 12 horas. De igual forma Holah (2005), enfatiza que las fábricas tienen que segregar por "zonas" de producción por razones de higiene, se han creado una serie de zonas de mayor higiene o limpieza para ayudar a proteger el producto de los eventos de contaminación cruzada microbiológica después de haber sido tratado con calor o descontaminado. Esta zona después del proceso de descontaminación según Holah (2011) la clasifica como de alto cuidado o riesgo.

En función de los criterios indicados por el ICMSF (2018); BRC (2018) en el literal 3.5.1.- IDENTIFICACIÓN DE ZONA DE PRODUCTO EXPUESTO Identificación de zona de producto expuesto se elaboró matriz de diagnóstico de zona de producto

expuesto de mayor riesgo detallado en la Tabla 8 con preguntas claves que ayudaron a identificar las etapas de producto expuestas de riesgo, que es propensa a la contaminación microbiológica de bacterias formadoras de histamina para la línea de atún precocido congelado, en la primera columna de la tabla se detalló todas las etapas de proceso que involucraron la elaboración del atún precocido congelado, las cuales fueron: descarga, clasificación, almacenamiento, descongelación, eviscerado, precocción, enfriamiento, acondicionamiento, limpieza, empaque, sellado, detector de metales, congelación, estiba, etiquetado, embarque, la descripción de cada etapa están indicadas en 2.4.- UNIDAD DE ANÁLISIS Unidad de análisis.

Posterior a la colocación de las etapas de proceso se procedió a realizar 4 preguntas claves que se realizaron considerando cada etapa, las cuales fueron:

- ¿El producto favorece el desarrollo de microorganismos formadores de histamina?
- ¿El producto está expuesto a temperatura ambiente por encima de 4.4 °C?
- ¿El producto en esta etapa, está expuesto al ambiente de proceso, es decir, no están envasados, ni encerrados en depósitos, tuberías u otros?
- ¿La etapa producto en esta etapa esta después de un tratamiento térmico que ayude a eliminar bacterias formadoras de histamina?

Se contabilizó las respuestas por cada etapa de proceso que indican “sí”, la zona se categorizó como zona de producto expuesto de riesgo cuando a las 4 preguntas la respuesta fue “sí”. Las etapas que calificaron como “zona de producto expuesto de riesgo” fueron la etapa de enfriamiento, acondicionamiento, limpieza y empaque, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8

Matriz de diagnóstico de zona de producto expuesto de mayor riesgo.

Enlistar las etapas del proceso	¿El producto favorece el desarrollo de microorganismos formadores de histamina?	¿El producto está expuesto a temperatura ambiente por encima de 4.4 °C?	¿El producto en esta etapa, está expuesto al ambiente de proceso, es decir, no están envasados, ni encerrados en depósitos, tuberías u otros?	¿La etapa producto en esta etapa esta después de un tratamiento térmico que ayude a eliminar bacterias formadoras de histamina?	Cuantificar las respuestas que indiquen "Si".	Zona de producto expuesto de riesgo.
Descarga	Si	Si	Si	No	3	Negativo
Clasificación	Si	Si	Si	No	3	Negativo
Almacenamiento	Si	No	Si	No	2	Negativo
Descongelación	Si	Si	Si	No	3	Negativo
Eviscerado	Si	Si	Si	No	3	Negativo
Precocción	Si	Si	Si	No	3	Negativo
Enfriamiento	Si	Si	Si	Si	4	*Positivo
Acondicionamiento	Si	Si	Si	Si	4	*Positivo
Limpieza	Si	Si	Si	Si	4	*Positivo
Empaque	Si	Si	Si	Si	4	*Positivo
Sellado	Si	Si	No	Si	3	Negativo
Detector de metales	Si	Si	No	Si	3	Negativo
Congelación	Si	No	No	Si	2	Negativo
Estiba y etiquetado	Si	No	No	Si	2	Negativo
Embarque	Si	No	No	Si	2	Negativo

Nota. Fuente: Autor de la investigación adaptado de ICMSF (2018); BRC (2018).

* Zona de producto expuesto de riesgo

De manera gráfica las etapas de proceso que fueron consideradas como zona de producto expuesto de riesgo, fueron identificadas en el diagrama de proceso y son todas las etapas cubiertas con el cuadro color amarillo, como se muestra en Figura 7.

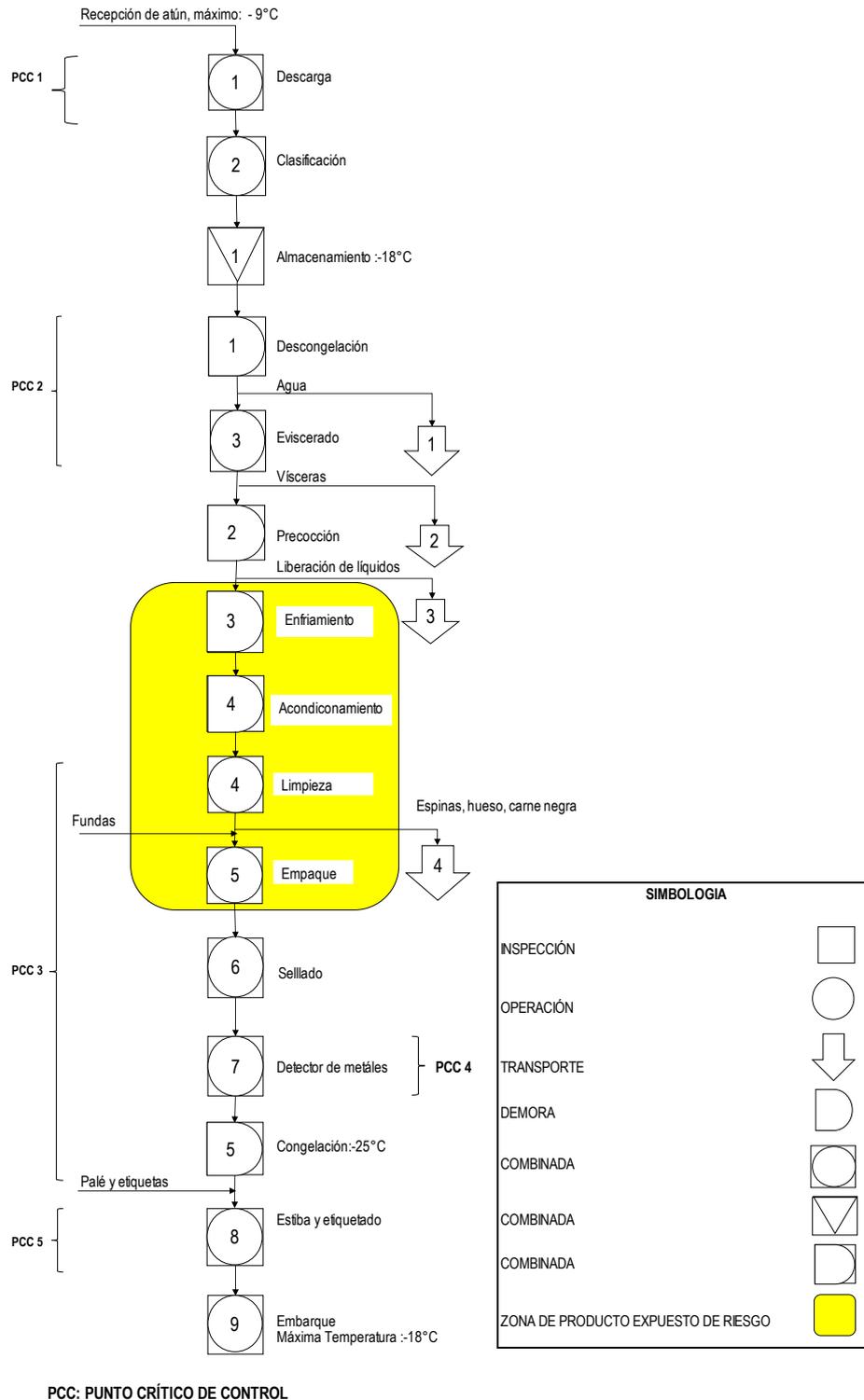


Figura 7 Identificación de zona de producto expuesto de riesgo
Fuente: Autor de la investigación, adaptado de ICMSF (2018)

De manera similar el ICMSF (2018) detalla un diagrama de flujo para salmón ahumado congelado el cual consta de las etapas de: recepción, almacenamiento, fileteado, salazón, maduración, secado, ahumado, enfriamiento, despellejado, rebanado, pesado, empaque, almacenamiento y distribución. En el diagrama realiza la identificación de producto expuesto de riesgo las cuales fueron: enfriamiento, despellejado, rebanado, pesado y empaque, es decir las etapas seleccionadas están a partir del proceso térmico que se da en la etapa del ahumado y que posterior a la misma están expuestas a las condiciones del ambiente del proceso hasta su empackado.

4.2.- PRESENCIA DE BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA EN MUESTRAS DE SUPERFICIES Y AIRE EN ZONA DE PRODUCTO EXPUESTO DE RIESGO

Una vez identificada la zona de producto expuesto de riesgo que involucra la etapa de enfriamiento, acondicionamiento, limpieza y empaque, se procedió a identificar los puntos de muestreo por zona, los principios de la zonificación identifican y diferencian las áreas de procesamiento dentro las instalaciones donde existen las potenciales fuentes de contaminación por agentes patógenos y no patógenos debido al aire, personas, equipamientos y materiales, estas zonas se clasifican en: zona 1, zona 2, zona 3 y zona 4, cuyo concepto está descrito en el literal 3.5.2. Identificación de zonas de muestreo.

Dentro de las 4 zonas se identificaron puntos de muestreo de superficies, distribuidos de la siguiente manera: zona 1; 8 puntos de muestreo, zona 2; 5 puntos de muestreo, zona 3; 9 puntos de muestreo y en zona 4; 6 puntos de muestreo. A cada muestra de superficie se asignó tres dígitos, el primer dígito es la z referente a la primera letra de la palabra zona, posterior sigue una numeración del 1 al 4 donde se utilizó el número 1 para todas las superficies de zona 1 y así de forma sucesiva hasta llegar al 4 referente a la zona 4, el tercer dígito es una secuencia numérica conforme se fueron identificando las muestras por zona. Estos puntos fueron escogidos tomando el criterio de la norma ISO

18593: (2018) esta norma también establece que el muestreo no se debe limitar solo a los puntos descritos en la misma, por su parte Delgado et al. (2004) establece que esta selección de puntos corresponden a un muestreo no probalístico denominado “muestreo por juicio” o de “expertos”; en este método la persona más capaz en el tema de estudio selecciono las muestras por tal motivo se contó con la ayuda del Blgo. David Sierra Zambrano jefe del laboratorio de microbiología de la empresa Marbelize S.A. A continuación se establece una comparación de puntos de muestreos seleccionados en esta investigación que coinciden con puntos indicados por Padilla (2015) de los cuales 4 puntos no están referenciados y por Simmons & Wiedmann (2018) de los cuales 2 puntos no están referenciados y coincide con la norma ISO 18593: (2018), estos puntos adicionales fueron identificados por el experto Blgo. David Sierra Zambrano, tal como se muestra en Tabla 9.

Tabla 9
Puntos de muestreos para análisis microbiológicos de superficies

SUPERFICIES					
Categorización de zona	Descripción de muestras	Código asignado	Superficies referenciadas por Padilla (2015)	Superficies referenciadas en norma ISO 18593:2018	Superficies referenciadas por Simmons & Wiedmann (2018)
Zona 1	Manos	Z11	SI	SI	SI
	Mesas metálicas	Z12	SI	SI	SI
	Bandas	Z13	SI	SI	SI
	Mandiles plásticos	Z14	NO	SI	SI
	Bandejas plásticas	Z15	SI	SI	SI
	Fichas de identificación de bandejas	Z16	NO	NO	NO
	Cuchillos	Z17	SI	SI	SI
	Canastas de colocar pescado	Z18	SI	SI	SI
Zona 2	Coches metálicos	Z21	SI	SI	SI
	Plato de balanza	Z22	SI	SI	SI
	Lámina de coches metálicos	Z23	SI	SI	SI
	Botoneras	Z24	NO	SI	SI
Zona 3	Banda de equipo detector de metales	Z25	SI	SI	SI
	Pisos	Z31	SI	SI	SI
	Drenajes	Z32	SI	SI	SI
	Bases donde se para el personal	Z33	SI	SI	SI
	Paredes	Z34	SI	SI	SI
	Zócalos	Z35	SI	SI	SI
	Banda de desperdicio	Z36	SI	SI	SI
	Selladoras	Z37	SI	SI	SI
	Balanzas de piso	Z38	SI	SI	SI
	Botas	Z39	NO	NO	NO
	Zona 4	Bandas área de enlatado	Z41	SI	SI
Bandas área de preparación		Z42	SI	SI	SI
Piso área de preparación		Z43	SI	SI	SI
Piso área de enlatado		Z44	SI	SI	SI

Piso área de pouch	Z45	SI	SI	SI
Piso área de túneles de congelación	Z46	SI	SI	SI

Nota.Fuente: Autor de la investigación.

Padilla (2015); Beno et al. (2016); Simmons & Wiedmann (2018); Stevens & Hood (2019); Magdovitz, Gummalla, Thippareddi, & Harrison (2020); Jones, Ricke, Keith Roper, & Gibson (2020) hacen referencia a la importancia e implementación de la zonificación microbiológica, ya que se basa en la probabilidad de contaminación del producto si un microorganismo transmitido por alimentos estuviera presente dentro de la misma. En las investigaciones realizadas por Gingerich, et al. (2001); Grey, Green, Bolton, Jaykus, & Cope (2005); Hwang et al. (2011) sobre bacterias formadoras de histamina en superficies en empresas relacionadas a pescado fresco refrigerado, no realizaron la identificación de los puntos de muestreos por zonificación, esto está relacionado a que el concepto de zonificación en empresas procesadoras de alimentos fue posterior a sus investigaciones.

Con respecto a los puntos de muestreo de aire se identificaron 4 puntos que están ubicados dentro de la zona 1, 2 y 3. que corresponden a la zona de producto expuesto de riesgo, que corresponden a la etapa enfriado, acondicionado, mesas de limpieza y empaque, adicional una muestra de la zona 4 que corresponde al ambiente del área de descongelamiento y eviscerado. Estas muestras se codificaron asignando un primer dígito que es la letra z referente a la primera letra de la palabra zona, seguido se dio una numeración 123 para aquellos ambientes procedentes de las zonas 1, 2 y 3, para aquel punto que está en la zona 4 se asignó el número 4, posterior se asignó las letras del alfabeto que empezó con la letra A, conforme se identificaron los puntos por zonas de muestreo, tal como se muestra en Tabla 10.

Tabla 10
Puntos de muestreos para análisis microbiológicos en aire.

AMBIENTES		
Categorización de zona	Descripción de muestras	Código asignado
Zona 1 - Zona 2 - Zona 3	Ambientes mesas de limpieza de pescado y empaque	Z123A
	Ambientes área de enfriado	Z123B
	Ambientes área de acondicionamiento	Z123C
Zona 4	Ambiente área de descongelación y eviscerado	Z4A

Nota.Fuente: Autor de la investigación.

Basante & Franco (2011) realizaron un estudio referente a establecer un sistema para el monitoreo y cierre de no conformidades microbiológicas en ambientes, superficies y manipuladores del área de desposte en un frigorífico de la ciudad de Manizales – Colombia en su investigación tomaron en consideración tres muestras de análisis de ambientes, de manera similar el ICMSF (2018) detalla un diagrama de flujo para salmón ahumado congelado el cual consta de las etapas de: recepción, almacenamiento, fileteado, salazón, maduración, secado, ahumado, enfriamiento, despellejado, rebanado, pesado, empaque, almacenamiento y distribución. En el diagrama realiza la identificación de producto expuesto de riesgo las cuales fueron: enfriamiento, despellejado, rebanado, pesado y empaque, estas etapas son las que considera en el muestreo de ambientes es decir 5 puntos de muestreo.

Una vez seleccionados los puntos de muestreos se procedió a realizar la toma de muestras para el caso de las muestras de superficies se realizó con la metodología se hisopos húmedos, referenciada en la norma ISO 18593: (2018), en investigaciones realizadas por Gingerich, et al. (2001); Grey, Green, Bolton, Jaykus, & Cope (2005); Hwang et al. (2011) sobre bacterias formadoras de histamina en superficies, la toma de las muestras en superficies la realizaron bajo la metodología de hisopado. En el Anexo 5 muestra una referencia de cómo se procedió con la toma de muestra en superficie en esta investigación

Para el caso del muestreo de aire se usó equipo **MAS 100 (Merck)**, esta metodología fue usado Engelbart et al. (2007) para el muestreo del hongo *Aspergillus fumigatus*, Chang & Hung (2012) para el muestreo de aire en estudio realizado de bacterias de la familia *Legionellae* y Bottale & Riera (2016) uso equipo muestreador de aire para bacterias aerobias y hongos. Al día 13 de marzo del 2020 no existe referencia de estudios que hayan usado el equipo **MAS 100 (Merck)** para toma de muestras de aire para análisis de bacterias formadoras de histamina De acuerdo con Haig, Mackay, Walker, & Williams (2016); Reponen (2017) el uso de equipos muestreadores de aire es considerado como un método activo, según Masotti, Cattaneo, Stuknytė, & De Noni (2019). indica que los equipos muestreadores de aire son de uso frecuente en la industria de los alimentos y el impedimento que existe en su implementación es el costo del

equipo. King et al. (2020) indica que los equipos muestreadores de aire está dentro de las técnicas modernas para contajes de bacterias. En el Anexo 6 muestra una referencia de cómo se procedió con la toma de muestra de aire con equipo **MAS 100 (Merck)**.

Para el análisis de bacterias formadoras de histamina no existe un medio de cultivo listo para su uso que se comercialice, por tal motivo hay que comprar sus ingredientes de manera separada y prepararlo, para esta investigación se usó el medio de cultivo descubierto por Niven et al, (1981) y modificado por Mavromatis & Quantick (2002) y Guillén et al. (2004). Para la confirmación de las colonias se usó el caldo de cultivo modificado de Niven's usado por Moreira (2018). Los ingredientes del agar modificado de Niven's está detallado en 3.5.6 y el caldo modificado de Niven's está descrito en 2.2.3. En esta investigación se usó el método de confirmación con el caldo de Niven's para reducir el riesgo de contabilizar falsos positivos ya que en investigaciones realizadas por Actis et al. (1999); Economou et al. (2006); Bjornsdottir et al. (2009) evaluaron el agar de Niven et al, (1981) e indicaron presenta el riesgo de contar falsos positivos. Sin embargo en investigación realizada por Chen, Wei, Koburger, & Marshall (1989) realizo pruebas con 4 medios de cultivos incluido el agar de Niven et al, (1981) para determinar bacterias formadoras de histamina en atún, obteniendo el mejor desempeño con el agar de Niven et al, (1981). En investigaciones realizadas por Gingerich, et al. (2001); Grey, Green, Bolton, Jaykus, & Cope (2005); Hwang et al. (2011) usaron el agar de Niven et al, (1981) para determinar bacterias formadoras de histamina en muestras de superficies y usaron métodos bioquímicos para realizar la identificación de las especies bacterianas.

En el Anexo 7 se observa cómo se realizó el proceso de análisis de bacterias formadoras de histamina en superficies usando el agar modificado de Niven's, en el Anexo 8 se muestra referencia de las colonias con halo color purpura que se obtuvo en esta investigación y se interpretó como resultados presuntivos usando el agar modificado de Niven's, en el Anexo 9 se evidencia referencia de un resultado positivo que se obtuvo en prueba para confirmar bacterias formadoras de histamina usando el caldo modificado de Niven's y en Anexo 10 se muestra referencia de un resultado negativo que se obtuvo en prueba de confirmación de

bacterias formadoras de histamina usando el caldo modificado de Niven´s. De forma resumida se muestra en la Figura 8 y Figura 9 se muestra cómo se efectuó el análisis de bacterias formadoras de histamina para muestras de superficies y aire

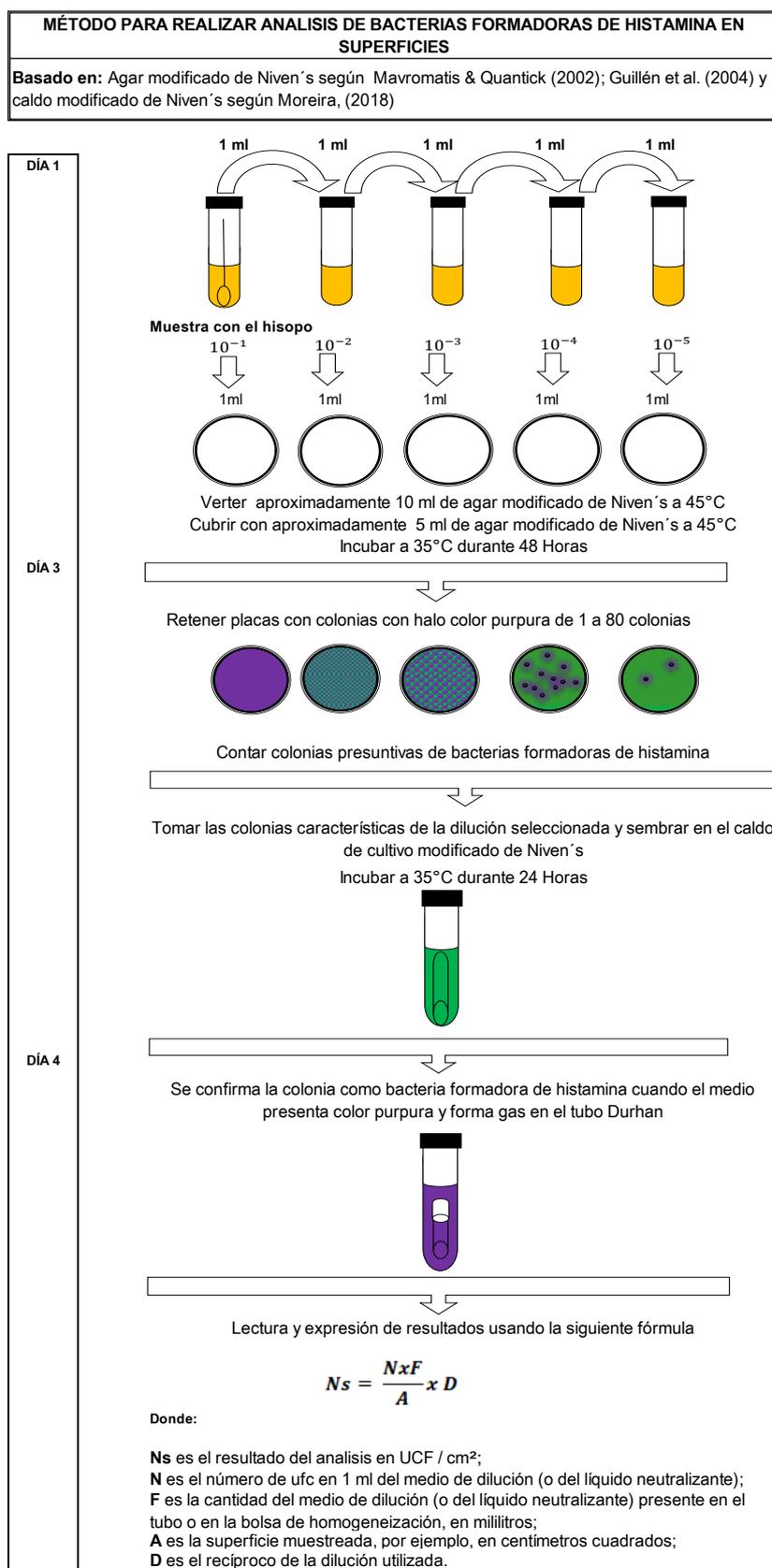


Figura 8 Diagrama de análisis de bacterias formadoras de histamina en muestras de superficies

Fuente: Autor de la investigación, adaptado de Mavromatis & Quantick (2002); Guillén et al. (2004); Moreira (2018); ISO 18593: (2018);

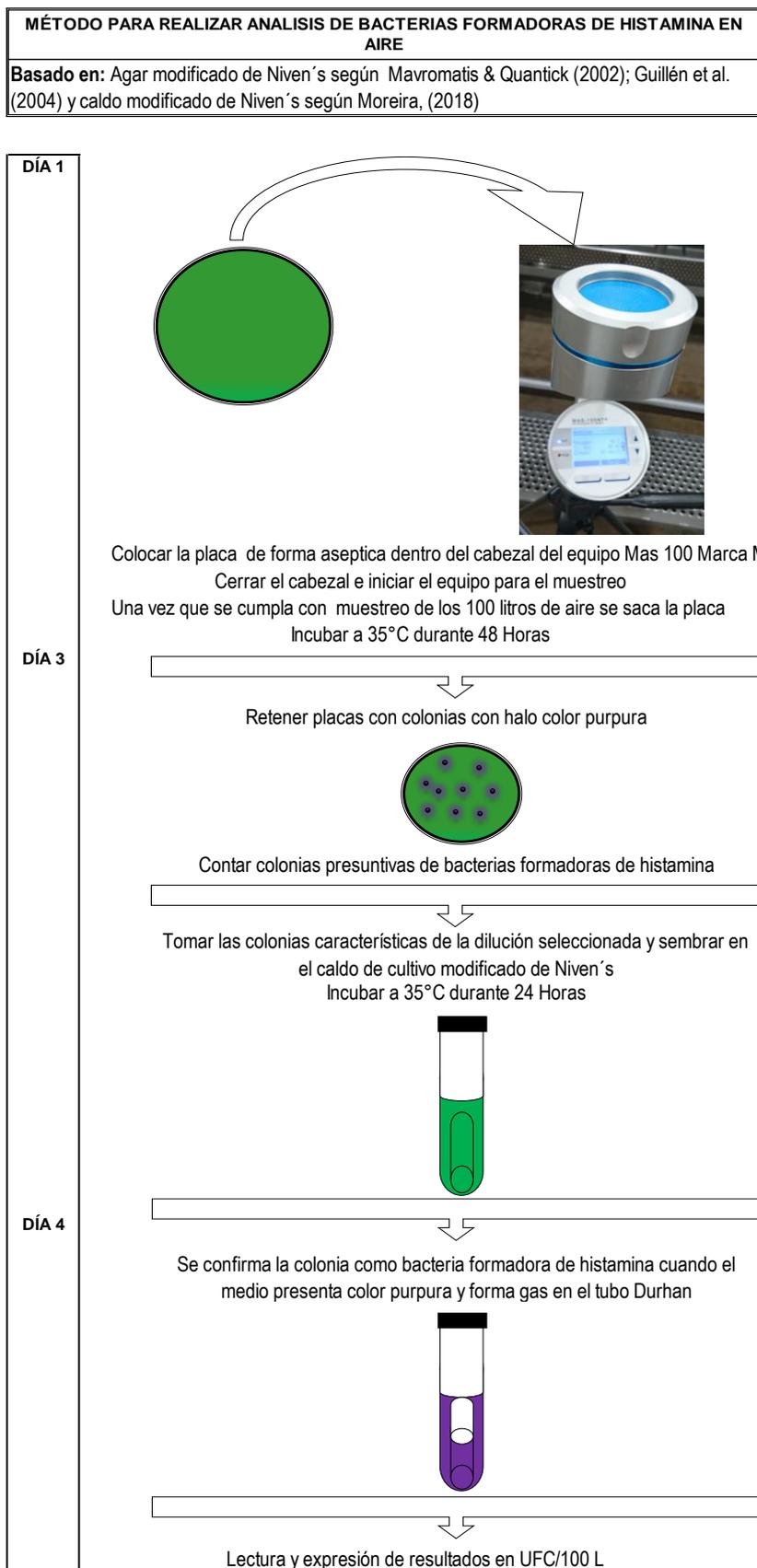


Figura 9 Diagrama para análisis de bacterias formadoras de histamina en muestras de aire

Fuente: Autor de la investigación, adaptado de Mavromatis & Quantick (2002); Guillén et al. (2004); Moreira (2018); Engelbart et al. (2007); Bottale & Riera (2016)

Los análisis se planificaron para obtener como mínimo 10 resultados de bacterias formadoras de histamina cuyos resultados cumplieron con la condición de pasar por prueba de eliminación de resultados atípicos. Una vez que comprobó la eliminación los resultados atípicos se procedió con el cálculo con los límites de alerta y límites de acción. Los procedimientos y fórmulas para los cálculos para eliminar datos atípicos, cálculo de los límites de alerta y límites de acción están descritos en literal 2.2.4. Límites de aceptación microbiológicos en ambientes y en el literal 3.5.6. Método de análisis para bacterias formadoras de histamina. Todos los resultados que se obtuvieron de forma individual, el reconocimiento de valores atípicos y los resultados de los cálculos de los límites de alerta y acción están descritos en el Anexo 3 y Anexo 4

Dentro de los 28 puntos de muestreo se encontró resultados atípicos en 7 puntos de muestreo esto representa el 25% de incidencia. De los 7 puntos donde se encontró valores atípicos se distribuyeron de la siguiente forma, Zona 1 se encontró 1 resultado atípico, zona 3 se encontró 1 resultado atípico y zona 4 se encontró 5 resultados atípicos que representa el 71.4% de incidencia, en zona 2 no se encontró incidencia de resultados atípicos. Los resultados atípicos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11
Resultados atípicos en muestras de superficies

Categorización de zona	Código asignado a la muestra	Superficies	
		Resultado de cálculo para encontrar valores atípicos	Resultados de bacterias formadoras de histamina (UFC/cm ²)
Zona 1	Z15	11,0	20
Zona 3	Z38	14,3	46
Zona 4	Z42	9,0	21
Zona 4	Z43	5,0	900
Zona 4	Z44	10,6	30
Zona 4	Z45	12,0	27
Zona 4	Z46	6,3	12

Nota. Fuente: Autor de la investigación.

El reconocimiento de resultados atípicos fueron propuestos por Basante & Franco (2011); Iguarán et al. (2011); Corpas (2012); Iguarán, Bastidas, & Rodríguez (2014), estos últimos investigadores escogieron 13 puntos de muestreos para establecer límites de alerta y acción para coliformes totales de los cuales en 3

puntos encontraron valores atípico, esto representa el 23% de incidencia del total de puntos muestreados y de los resultados atípicos todos corresponden a zona 1, superficies de contacto directo con el alimento es decir el 100% incidencia. Con respecto a los resultados microbiológicos de bacterias formadoras de histamina en muestras de aire no se encontró incidencia de resultados atípicos. Corpas (2009) indica que los límites de alerta y acción permiten realizar un proceso interpretativo de los reportes de análisis microbiológicos en muestras de superficies y aire, alejado de subjetividades e intereses personales.

En la Tabla 12, se observa los resultados de los cálculos de los intervalos de tolerancias el cual incluye límites de alerta y acción que la empresa Marbelize S.A, podrá usar para realizar los controles de las bacterias formadoras de histamina en superficies. En referencia a las muestras de superficies se escogieron 28 puntos de muestreos para análisis de bacterias formadoras de histamina, de los cuales, en 24 de ellos, se identificaron bacterias formadoras de histamina esto representa el 85.7% de incidencia. Así mismo en el trabajo realizado por Gingerich, et al. (2001) escogieron 18 puntos de muestreos y encontraron bacterias formadoras de histamina en 4 puntos, los cuales fueron: cuchillos, pisos de sala de proceso, agua tibia para la inmersión manos y cartones para colocar el pescado, esto representa el 22% de incidencia. De igual forma Grey, Green, Bolton, Jaykus, & Cope (2005) aislaron bacterias formadoras de histamina en cuchillos, canastas donde se coloca el pescado y cajas de embalaje. Por último, Hwang et al. (2011) escogió 21 puntos de muestreos distribuidos en 3 empresas procesadoras de pescado de los cuales aisló bacterias formadoras de histamina en 3 puntos de muestreos y que fueron pisos de las salas de proceso de 2 de las 3 empresas escogidas, esto representa el 14% de incidencia.

Gingerich, et al. (2001); Grey et al (2005); Hwang et al. (2011) hacen referencia a la presencia de bacterias formadoras de histamina, pero no proporcionan información sobre el conteo de los microorganismos, en esta investigación se cuantifico y se cálculo los límites de alerta y acción, las cuales están indicadas en la Tabla 12.

Tabla 12

Intervalos de tolerancias para bacterias formadoras de histamina en superficies

Categorización de zona	Descripción de muestras	Código asignado	Límites de alerta UFC/cm²	Límites de acción UFC/cm²
Zona 1	Manos	Z11	1	1
	Mesas metálicas	Z12	0	0
	Bandas	Z13	1506	1838
	Mandiles plásticos	Z14	8	10
	Bandejas plásticas	Z15	10	12
	Fichas de identificación de bandejas	Z16	2	2
	Cuchillos	Z17	1	1
Zona 2	Canastas de colocar pescado	Z18	1	1
	Coches metálicos	Z21	2	2
	Plato de balanza	Z22	1	1
	Lámina de coches metálicos	Z23	3	4
	Botoneras	Z24	0	0
	Banda de equipo detector de metales	Z25	20	25
Zona 3	Pisos	Z31	13	16
	Drenajes	Z32	48	57
	Bases donde se para el personal	Z33	123	148
	Paredes	Z34	1	1
	Zócalos	Z35	0	0
	Banda de desperdicio	Z36	39	46
	Selladoras	Z37	0	0
	Balanzas de piso	Z38	25	32
	Botas	Z39	29	35
	Zona 4	Bandas área de enlatado	Z41	8
Bandas área de preparación		Z42	14	18
Piso área de preparación		Z43	1010	1212
Piso área de enlatado		Z44	17	21
Piso área de pouch		Z45	16	19
Piso área de túneles de congelación		Z46	8	10

Nota. Fuente: Autor de la investigación

Además de los límites de alerta y acción que se establecieron en las superficies, también es un factor determinante el monitoreo del aire ya que, según Ferguson, Cumbrell & Whitby (2019) las interacciones entre los vectores aire, empleados y superficies tienen un mayor riesgo de aumentar la propagación microbiana a través de suspensiones de partículas microscópicas sólidas o líquidas en el aire que se definen como aerosoles, citado por (Masotti et al. 2019). El mayor impacto en la contaminación microbiológica en el sector alimentario se conoce como bioaerosol y consiste en sustancias que contienen organismos vivos con diámetros de hasta 50 μm (Burfoot, 2016).

Para evaluar la propagación microbiológica en el aire se estudió las bacterias formadoras de histamina tomando como referencia la metodología propuesta en

3.5.4. sobre protocolo de toma de muestra. Se escogieron 4 puntos de toma muestras de los cuales, en dos de ellos que correspondieron a los ambientes de área de acondicionamiento y área de descongelación se identificaron bacterias formadoras de histamina donde se determinaron los límites que variaron desde 4 a 5 UFC /100 mL en área de acondicionamiento y de 8 a 10 UFC/100 mL en área de descongelación, tal como se muestra en la Tabla 13, esta diferencia se debe a que hay presencia de bioaerosol como ya indico Masotti et al. (2019). El área de descongelación está asociado a procesos de variaciones de temperatura que da lugar a exudados y condensación de líquidos donde quedan suspendidas las bacterias formadoras de histamina. Al día 13 de marzo del 2020 no existe estudios que hagan referencias a análisis de bacterias formadoras de histamina en muestras de aire.

Tabla 13
Intervalos de tolerancias para bacterias formadoras de histamina en muestras de aire

Ambientes				
Categorización de zona	Descripción de muestras	Código asignado	Límites de alerta UFC/100L	Límites de acción UFC/100L
Zona 1 - Zona 2 -	Ambientes mesas de limpieza de pescado	Z123A	0	0
	Ambientes área de enfriado	Z123B	0	0
Zona 3	Ambientes área de acondicionamiento	Z123C	4	5
Zona 4	Ambiente área de descongelación y eviscerado	Z4A	8	10

Nota. Fuente: Autor de la investigación

4.3.- DESARROLLO DEL PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL

De acuerdo a la norma BRC (2018) un programa de vigilancia ambiental como mínimo debe de tener:

- Un protocolo de muestreo.
- Los puntos donde se tomarán las muestras.
- Las frecuencias de los análisis.
- Los organismos, por ejemplo, agentes patógenos, organismos de descomposición u organismos indicadores.
- Los métodos de análisis.

- El registro y la evaluación de los resultados.
- Límites de control apropiados para el programa de vigilancia ambiental.

En el Anexo 11 se adjunta el diseño del programa de vigilancia ambiental para ser implementado en la empresa Marbelize S.A. Al día 13/03/2020 no existe programa de vigilancia ambiental para bacterias formadoras de histamina. Según Almond Board of California [ABC] (2010) establece una guía para programa de vigilancia ambiental para *Salmonella*, la empresa (3M Food Safety, 2019) elaboró una guía para el desarrollo de programa de vigilancia ambiental para microorganismos patógenos, microorganismos indicadores de higiene y microorganismos de descomposición, de acuerdo a los puntos establecidos por estos dos investigadores se alinean a los puntos que debe de llevar un programa de vigilancia ambiental de acuerdo a la norma BRC (2018) y se alinea al programa de vigilancia ambiental desarrollado en esta investigación.

En el Anexo 12 se muestra carta de la empresa Marbelize S.A, donde certifica que una vez que el programa de vigilancia ambiental para bacterias formadoras de histamina para la línea de atún precocido congelado, haya pasado por el proceso de aprobación académica, será expuesto en el comité de seguridad alimentaria de la empresa en mención para definir estrategias para su implementación.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.- CONCLUSIONES

Mediante la matriz de diagnóstico de identificación de zonas de productos expuestos de mayor riesgo aplicada en las etapas de proceso de la línea de atún precocido congelado en la empresa Marbelize S.A., se reconocen 4 etapas que se consideran como zonas de producto expuesto de riesgo, donde se direcciona el programa de vigilancia ambiental para bacterias formadoras de histamina, estas etapas son enfriamiento, acondicionamiento, limpieza y empaque.

Con la evaluación de los resultados de análisis microbiológicos de bacterias formadoras de histamina se reconocen resultados atípicos, se encontraron en el 25% de los puntos de muestreos de superficies y aportan información para identificar oportunidades de mejora. Las áreas donde se encontraron valores atípicos son zona 1: bandejas plásticas; zona 3: balanzas de piso; zona 4: bandas área de preparación, piso área de preparación, piso de área de enlatado, piso área de pouch, piso área de túneles de congelación. En muestras de aire no se identificaron resultados atípicos

El programa de vigilancia ambiental para bacterias formadoras de histamina en la línea de atún precocido congelado en la empresa Marbelize S.A establece límites de alerta y acción para realizar el control tanto en muestras de superficies y aire

De acuerdo a los pasos de análisis de bacterias formadoras de histamina con el agar modificado de Niven´s se elaboró diagrama para la secuencia de análisis e interpretación de resultados para muestras de superficies y aire.

5.2.- RECOMENDACIONES

Realizar la implementación del programa de vigilancia ambiental para el control de bacterias formadoras de histamina en la línea de atún precocido congelado de la empresa Marbelize S.A.

Documentar las medidas correctivas que deban adoptarse cuando los resultados de la vigilancia indiquen que no se ha cumplido un límite de control o que existe una tendencia al alza de positivos.

Una vez implementado el programa de vigilancia ambiental para bacterias formadoras de histamina en la línea de atún precocido congelado de la empresa Marbelize S.A., se deberá revisar el programa al menos una vez al año y siempre que haya cambios en las condiciones de proceso, en el flujo del proceso o en los equipos, se produzcan avances en el conocimiento científico y los resultados sean sistemáticamente negativos.

BIBLIOGRAFÍA

- 3M Food Safety. (13 de Junio de 2019). *News 3m*. Recuperado el 08 de Marzo de 2020, de <https://news.3m.com/3M-and-Cornell-Partner-to-Develop-Environmental-Monitoring-Handbook>
- Actis, L. A., Smoot, J. C., Barancin, C. E., & Findlay, R. H. (1999). Comparison of differential plating media and two chromatography techniques for the detection of histamine production in bacteria. *Journal of microbiological methods*, 39(1), 79-90.
- Almeida, J. S. (2008). *"Normas" privadas: el desafío para las exportaciones de los países en desarrollo*. Santiago de Chile, Chile: CEPAL.
- Almond Board of California [ABC]. (2010). <https://www.almonds.com/>. Recuperado el 13 de Marzo de 2020, de Pathogen environmental monitoring program.: http://www.almonds.com/sites/default/files/content/attachments/pem_book.pdf
- Basante, B. E., & Franco, R. I. (27 de Enero de 2011). Establecimiento de un sistema para el monitoreo y cierre de no conformidades microbiológicas en ambientes, superficies y manipuladores del área de desposte en un frigorífico de la ciudad de Manizales. Manizales, Colombia.
- Beno, S. M., Andrus, A. D., Ralyea, R. D., Kent, D. J., Martin, N. H., & Boor, K. J. (2016). Development and validation of pathogen environmental monitoring programs for small cheese processing facilities. *Journal of food protection*, 79(12), 2095-2106.
- Bjornsdottir, K., Bolton, G. E., McClellan, P. D., Jaykus, L. A., & Green, D. P. (2009). Detection of gram-negative histamine-producing bacteria in fish: a comparative study. *Journal of food protection*, 79(9), 1987 - 1991.
- Bottale, A., & Riera, C. (2016). Establecimiento de límites microbiológicos internos para áreas clasificadas Grado D. *Revista Cubana de Farmacia*, 50(1), 30-43.
- British Retail Consortium [BRC]. (Agosto de 2018). *Food Safety Issue 8. Global Standard*. Obtenido de [brcgsbookshop: https://www.brcgsbookshop.com/bookshop/food-safety/c-24/c-70](https://www.brcgsbookshop.com/bookshop/food-safety/c-24/c-70)
- British Retail Consortium[BRC]. (19 de Mayo de 2019). *BRC Directory*. Obtenido de <https://brcdirectory.co.uk/>
- Burfoot, D. (2016). Aerosols as a contamination risk. En I. H. industry. Woodhead Publishing.

- Chang, C. W., & Hung, P. Y. (2012). Evaluation of sampling techniques for detection and quantification of airborne legionellae at biological aeration basins and shower rooms. *Journal of aerosol science*, 48, 63-74.
- Chen, C. M., Wei, C. I., Koburger, J. A., & Marshall, M. R. (1989). Comparison of four agar media for detection of histamine-producing bacteria in tuna. *Journal of food protection*, 52(13), 808-813.
- Corpas, E. (2009). Procedimiento para el establecimiento de intervalos de tolerancia a partir del análisis microbiológico de ambientes, superficies y manos de operarios en empresas del sector agroalimentario. *Revista entre ciencia e ingeniería*, 13(1), 157.
- Corpas., I. E. (2012). Establecimiento de intervalos de tolerancia para el control de coliformes totales en el area de desposte bovino. *Entre ciencia e ingenieria*, 41-52.
- De Oliveira, C. F., Da Cruz, A., Tavolaro, P., & Corassin, C. (2016). Food Safety: Good Manufacturing Practices (GMP), Sanitation Standard Operating Procedures (SSOP), Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP). *In Antimicrobial food pack*, 129-139.
- DeBeer, J., Nolte, F., Lord, C. W., & Colley, J. &. (2017). Setting HACCP critical limits for the precooking CCP of commercially processed tuna . *Food Protection Trends*, 37(3), 176-188.
- Delgado, M., Escamilla, L., Pérez, A., & Arias, J. (2004). Determinación de parámetros de la contaminación microbiana presente en un área de fabricación de medicamentos estériles a base de antibióticos β -lactámicos. *Universitas Scientiarum*, 9(2), 23-33.
- Devivilla, S., Stephen, J., Lekshmi, M., Kumar, S. H., & Nayak, B. B. (2019). Evaluation of modified Zobell marine agar for differential isolation of histamine-forming bacteria from fresh fish. *Journal of microbiological methods*, 163.
- Economou, E., Papadopoulou, C., Levidiotou, S., Brett, M., & Seferiadis, K. (2006). An assessment of differential media for the recovery of histamine producing bacteria. *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology: Exploiting Microbes and Their Interactions*, 269-274.
- Emborg, J. (2007). *Morganella psychrotolerans* -Identification, histamine formation and importance for histamine fish poisoning.
- Enache, E., Kataoka, A., Black, D. G., Weddig, L., Hayman, M., & Bjornsdottir-Butler, K. (2013). Heat resistance of histamine-producing bacteria in irradiated tuna loins. *Journal of food protection*, 76(9), 1608-1614.
- Engelhart, S., Glasmacher, A., Simon, A., & Exner, M. (2007). Air sampling of *Aspergillus fumigatus* and other thermotolerant fungi: Comparative performance of the Sartorius MD8 airport and the Merck MAS-100 portable

bioaerosol sampler. *International journal of hygiene and environmental health*, 210(6), 733-739.

- Fathi, A. Z., Pooladgar, A. R., Maghami, S. G., & Rahman, L. (2013). The changes evaluation of biogenic amines (histamine) by hplc, in shanak yellow fin fish (*Acanthopagrus latus*) within 18 days of ice storage. *J. Sci. Res. and Tech*, 1(1), 29-34.
- Field-Cortazares, J., & Calderón-Campos, R. (2008). Escombroidosis, Intoxicación por Histamina. *Boletín Clínico Hospital Infantil del Estado de Sonora*, 25(2), 91-94.
- Food and Drug Administration [FDA]. (2018). *flseagrant*. Obtenido de HACCP (Análisis de peligros y puntos críticos de control); Programa de capacitación: https://www.flseagrant.org/wp-content/uploads/SGR-134_w
- Food and Drug Administration [FDA]. (24 de Abril de 2019). *Sampling to Protect the Food Supply*. Recuperado el 28 de agosto del 2019 Recuperado de <https://www.fda.gov/food/compliance-enforcement-food/sampling-protect-food-supply>
- Food and Drug Administration [FDA]. (Abril de 2011). *Fish and fishery products hazards and controls guidance*. Obtenido de Academia: https://www.academia.edu/6762304/Fish_and_Fishery_Products_Hazards_and_Controls_Guidance
- Gingerich, T. M., Lorca, T., Flick, G. J., McNair, H. M., & Pierson, M. D. (2001). Isolation of Histamine-Producing Bacteria from Fish-Processing Facilities and Fishing Vessels. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 10(3), 61-66.
- Grey, D. A., Green, D. P., Bolton, G. E., Jaykus, L. A., & Cope, W. G. (2005). Detection and identification of histamine-producing bacteria associated with harvesting and processing mahimahi and yellowfin tuna. *Journal of food protection*, 68(8), 1676-1682.
- Guillén, V. S., Ponce, A. E., Farrés, G. A., & Guerrero, L. I. (2004). Histamine production by two Enterobacteriaceae strains isolated from tuna (*Thunnus thynnus*) and jack mackerel (*Trachurus murphyi*). *International Journal of Food Properties*, 91-103.
- Haig, C. W., Mackay, W. G., Walker, J. T., & Williams, C. (2016). Bioaerosol sampling: sampling mechanisms, bioefficiency and field studies. *Journal of Hospital Infection*, 93(3), 242-255.
- Holah, J. (2005). Improving Zoning within Food Processing Plants. En Elsevier, *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry* (págs. 148-167). Elsevier.
- Holah, J. (2011). Hazard control by segregation in food factories. En J. Holah, *In Hygienic Design of Food Factories* (págs. 227-248). Woodhead Publishing.

- Hwang, C., Kung, H. F., Lin, C. S., Hwang, D. F., & Tsai, Y. H. (2011). Bacteriological quality and histamine-forming bacteria associated with fish meats and environments in HACCP and non-HACCP fish processing factories. *Food Control*, 22(10), 1657-1662.
- Ibrahim, H. K., Almayah, A. A., & Issa, A. H. (2017). Molecular Detection of Environmental *Morganella morganii* as Histamine Producing Bacteria. *Donnish Journal of Medicine and Medical Sciences*, 4(2), 08-13. Obtenido de <http://www.donnishjou>
- Iguarán, E. C., Carmona, P. H., Betancur, S. V., & Gonzáles, V. C. (2011). Detección de contaminación y establecimiento de intervalos de tolerancia en una planta productora de arepa. *Scientia et Technica*, 49, 286-291.
- Iguarán, E. J. (2012). Establecimiento de un sistema para el monitoreo y control de la contaminación cruzada en el laboratorio de análisis microbiológico de alimentos durante 2009. *Revista Ciencias de la Salud*, 10, 53-67.
- Iguarán, E. J., Bastidas, E. B., & Rodríguez, I. f. (2014). Procedimiento de monitoreo y cierre de no conformidades microbiológicas en el área de desposte bovino. *Revista Lasallista de Investigación*, 10(2), 35-43.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (2013). Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1772. Pescado en conserva. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización[INEN]. (2013). Norma Técnica Ecuatoriana INEN 184. Atún y bonito en conserva. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización[INEN]. (2013). Norma Técnica Ecuatoriana INEN 1896. Pescados frescos refrigerados o congelados de producción acuícola. Quito, Pichincha, Ecuador.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods [ICMSF]. (2018). *Microorganisms in foods 7: Microbiological testing in food safety management*. New York: Springer Science Business Media.
- International Organization for Standardization[ISO]. (2018). Norma Española UNE-EN ISO 18593 Microbiología de la cadena alimentaria Métodos horizontales para toma de muestras de superficies. España.
- Jackson, T. (2014). Management of Microbiological Hazards. *In Food Safety Management*, 889-917. doi:10.1016/B978-0-12-381504-0.00033-0
- Jones, S. L., Ricke, S. C., Keith Roper, D., & Gibson, K. E. (2020). Swabbing the surface: critical factors in environmental monitoring and a path towards standardization and improvement. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(2), 225-243.
- Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., & Baba, E. (2007). Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(3), 1467-1473.

- Kim, S. H., Price, R. J., Morrissey, M. T., Field, K. G., Wei, C. I., & An, H. (2020). Occurrence of Histamine-Forming Bacteria in Albacore and Histamine Accumulation in Muscle at Ambient Temperature. *Journal of Food Science*, 67(4), 1515-1521.
- King, M. D., Lacey, R. E., Pak, H., Fearing, A., Ramos, G., Baig, T., & Koustova, A. (2020). Assays and Enumeration of Bioaerosols-Traditional Approaches to Modern Practices. *Aerosol Science and Technology*, 1-38.
- Lakshmanan, P. T. (2000). Fish spoilage and quality assessment. *Society of Fisheries Technologists*, 26-40.
- Landete, J. M., Pardo, I., & Ferrer, S. (2006). Histamine, histidine, and growth-phase mediated regulation of the histidine decarboxylase gene in lactic acid bacteria isolated from wine. *FEMS microbiology letters*, 260(1), 84-90.
- Lewis, A. H., McCoy, I. M., & Campling, E. H. (2011). Market and Industry Dynamics in the Global Tuna Supply Chain. Isolation of Histamine-Producing Bacteria from Fish-Processing Facilities and Fishing Vessels. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 3, 61-66.
- Magdovitz, B. F., Gummalla, S., Thippareddi, H., & Harrison, M. A. (2020). Journal of Food Protection. *Evaluating Environmental Monitoring Protocols for Listeria spp. and Listeria monocytogenes in Frozen Food Manufacturing Facilities*, 83(1), 172-187.
- Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknytė, M., & De Noni, I. (2019). Airborne Contamination in the Food Industry: An Update on Monitoring and Disinfection Techniques of Air» 90:147-56. *Trends in Food Science & Technology*, 147-156.
- Mavromatis, P., & Quantick, P. C. (2002). Modification of Niven's medium for the enumeration of histamine-forming bacteria and discussion of the parameters associated with its use. *Journal of food protection*, 65(3), 546-551.
- Moreira, J. D. (2018). *Segurança microbiológica e bactérias produtoras de histamina em cavala (Scomberomorus cavalla Cuvier, 1829) e dourado (Salminus brasiliensis Cuvier, 1816) comercializados em MACEIÓ-AL*. Maceió, Alagoas, Brasil.
- National Fisheries Institute [NFI]. (16 de Abril de 2014). *Canned-Tuna-HACCP-Handbook*. Obtenido de <https://www.aboutseafood.com/wp-content/uploads/2008/04/Canned-Tuna-HACCP-Handbook-4-16-2014.pdf>
- Niven, C. F., Jeffrey, M. B., & Corlett, D. A. (1981). Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(1), 321-322.
- Nolte, F., Black, D. G., DeBeer, J., & Enache, E. (2014). Use of end point internal product temperature to control histamine formation in tuna at pre-cooking step. *Food Protection Trends*, 34(2), 94-100.

- Padilla, G. R. (2015). *Higiene y saneamiento en la industria alimentaria*. Miraflores, Lima, Perú: Macro.
- PDYOT, P. d. (2015). *Gobierno Autonomo Descentralizado de Manabí*. Obtenido de ISSUU: https://issuu.com/gadmanabi/docs/pdyot_20manabi_20actualizado
- Pinillos, M. A., Gómez, J., Elizalde, J., & Dueñas, A. (2003). Intoxicación por alimentos, plantas y setas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26, 243-265.
- Ragasa, C., Thornsby, S., & Bernsten, R. (2011). Delisting from EU HACCP certification: Analysis of the Philippine seafood processing industry. *Food Policy*, 36(5), 694-704.
- Rapid Alert System for Food and Feed [RASFF]. (13 de Mayo de 2019). *Portal RASFF de la Comisión Europea*. Obtenido de webgate.ec.europa.eu: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList>
- Reponen, T. (2017). Sampling for Microbial Determinations. En Springer, C. Viegas, A. Gomes, M. Täubel, & R. Sabino (Edits.), *Exposure to Microbiological Agents in Indoor and Occupational Environments* (págs. 85-96).
- Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo[SENPLADES]. (2017). *Plan Nacional de Desarrollo 2017-2021*. Obtenido de Toda una Vida: https://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/10/PNBV-26-OCT-FINAL_0K.compressed1.pdf
- Simmons, C. K., & Wiedmann, M. (2018). Identification and classification of sampling sites for pathogen environmental monitoring programs for *Listeria monocytogenes*: Results from an expert elicitation. *Food Microbiology*, 75, 2-17. doi:10.1016/j
- Stevens, K., & Hood, S. (2019). Food Safety Management Systems. *Food Microbiology: Fundamentals And Frontiers*, 1007-1020.
- Surya, T. S., Alamelu, V., Priyatharshini, A., Arisekar, U., & Sundhar, S. (20 de Marzo de 2019). Rapid methods for histamine detection in fishery products. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(3), 2035-2046. doi:10.20546
- Taylor, S. L., & Speckhard, M. W. (1983). Isolation of histamine-producing bacteria from frozen tuna. *Marine Fisheries Review*, 45(44), 6.
- Taylor, S. L., Stratton, J. E., & Nordlee, J. A. (1989). Histamine Poisoning (Scombroid Fish Poisoning): An Allergy-Like Intoxication. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 27(4-5), 225-240.

- Torres, S., Roeckel, M., & Martí, M. C. (2002). Histamine formation by *Morganella morganii* isolated from *Trachurus murphyi* (Chilean mackerel). *Latin American applied research*, 32(2), 205-208.
- Walpole, R. E., Myers, R. H., Myers, S. L., & Ye, K. (2012). *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias* (Novena ed.). México: Pearson Educación.
- Worobo, R., Snyder, A., & Lingle, C. (2019). Environmental Monitoring Handbook for the Food and Beverage Industries. En *Environmental monitoring for spoilage organisms* (pág. 57).
- Yoshinaga, D. H., & Frank, H. A. (1982). Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 447-452.
- Zacharski, K. A., Southern, M., Ryan, A., & Adley, C. C. (2018). Journal of Food Protection. *Evaluation of an Environmental Monitoring Program for the Microbial Safety of Air and Surfaces in a Dairy Plant Environment*, 81(7), 1108-1116.
- Zoellner, C., Ceres, K., Ghezzi-Kopel, K., Wiedmann, M., & Ivanek, R. (2018). Design Elements of *Listeria* Environmental Monitoring Programs in Food Processing Facilities: A Scoping Review of Research and Guidance Materials: *Listeria* environmental monitoring programs in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5), 1156-1171.
- Zwietering, M. H., Jacxsens, L., M., J., M., Nauta, M., & Peterz, M. (2016). Relevance of microbial finished product testing in food safety management. *Food Control*, 60, 31 -43.

ANEXO

ANEXO 1

Métodos horizontales para toma de muestras de superficies

Según la norma UNE-EN ISO 18593 (ISO 18593:2018)

Principio:

Los planes de muestreo tienen el objetivo de evaluar los niveles de contaminación microbiológica de las superficies del entorno de la cadena alimentaria para implementar acciones correctivas que eviten la contaminación de los alimentos por microorganismos.

Medios de cultivo y reactivos:

Diluyente, el diluyente va a ser agua de peptona tamponada estéril.

Neutralizantes, debido al uso principalmente de hipoclorito de sodio como agente sanitizante donde se realiza el estudio, se toma en cuenta la adición de un agente neutralizantes que consta de la siguiente composición: tiosulfato sódico, entre 3 g/l y 20 g/l, más polisorbato 80, 30 g/l y lecitina, 3 g/l.

Equipamiento y material fungible:

Hisopo estéril, un bastoncillo con algodón.

Recipientes, tubos de ensayo con tapa rosca, aptos para esterilización y almacenamiento de los medios de cultivo.

Hielera, una caja con aislamiento que contenga acumuladores de frío, capaz de mantener las muestras a baja temperatura durante su transporte al laboratorio.

Agitador, para mezclar líquidos dentro de tubos de cultivo.

Molde reutilizable estéril, que abarque un área definida de 10 cm².

Criterios de selección de superficie a muestrear:

Pueden encontrarse microorganismos en superficies visiblemente limpias, pero se encuentran con mayor frecuencia en lugares sucios y húmedos, donde las bacterias pueden crecer y persistir. Los sitios de difícil acceso tales como agujeros o hendiduras equipos porosos o fibrosos difíciles de limpiar, así como materiales oxidados o huecos, son lugares potenciales para la acumulación que deberían utilizarse para la toma de muestras. Puede resultar complicado realizar la toma de muestras en superficies inaccesibles donde se pueden acumular desperdicios de alimentos.

En sitios inaccesibles puede ser necesario desmontar el equipo para realizar la toma de muestras. A continuación, se indica una referencia no exhaustiva de ubicaciones potenciales de los puntos de toma de muestras.

- Superficies que no entran en contacto con alimentos: desagües, suelos, encharcamientos en el suelo, equipos de pesaje de suelo, cintas transportadoras, montacargas, carretillas, carros, máquinas de hielo, delantales, paredes.
- Superficies que entran en contacto con alimentos: cintas transportadoras, rebanadoras, tablas de corte, cortadoras, depósitos, trituradoras, mezcladoras, peladoras, máquinas de ensamblaje, equipamiento de llenado y envasado, contenedores, guantes y manos.

Procedimiento usando hisopos humedecidos, para utilizar un hisopo humedecido, se retira el hisopo de su envoltorio estéril y se humedece la punta sumergiéndola en un tubo que contenga el diluyente/neutralizante. Se presiona la punta del hisopo contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de diluyente/neutralizante. Se coloca la punta del hisopo sobre la superficie que se va a examinar y se frota un área estimada de 100 cm² usando el delimitador estéril del área que tiene una dimensión de 10 x 10 cm, mientras se hace rotar el mango del hisopo entre el pulgar y el índice. En el caso de superficies planas, la

toma de muestras se debe realizar en dirección vertical y horizontal, por ejemplo 10 veces en cada dirección.

En el caso de las superficies pequeñas de difícil acceso, se verifica que se recoge la muestra de la localización descrita completa, incluidas las hendiduras, huecos, conexiones entre superficies, etc. El hisopo se devuelve al tubo con diluyente/neutralizante. Se comprueba que el tubo queda cerrado de forma que el hisopo permanezca húmedo hasta el análisis.

Se añade una cantidad suficiente de medio de enriquecimiento/diluyente para cubrir el hisopo, para el estudio se uso 10 mL en los hisopos que se usan el muestreo y 9 mL para realizar las diluciones. El contenido se homogeneiza exhaustivamente usando el vórtex.

En el caso de los recuentos, esta preparación representa la suspensión inicial. Para el recuento de los microorganismos que se van a analizar en el laboratorio, debe utilizarse la suspensión inicial y diluciones decimales adicionales para determinar el número de microorganismos.

Cálculos y expresión de los resultados:

Se calcula el número de UFC en relación a la superficie de la que se han recogido las muestras cuando ésta no se puede medir, o por centímetro

$$Ns = \frac{NxF}{A} \times D$$

cuadrado, utilizando la fórmula

[1]:

$$Ns = \frac{NxF}{A} \times D$$

[1]

Donde

N es el número de ufc en 1 mL del medio de dilución (o del líquido neutralizante);

F es la cantidad del medio de dilución (o del líquido neutralizante) presente en el tubo o en la bolsa de homogeneización, en mililitros;

A es la superficie muestreada, por ejemplo, en centímetros cuadrados (A es igual a 1 cuando el área no se puede medir)

D es el recíproco de la dilución utilizada.

ANEXO 2

Factores de tolerancias para distribuciones normales.

n	Intervalos bilaterales						Intervalos unilaterales					
	$\gamma = 0.05$			$\gamma = 0.01$			$\gamma = 0.05$			$\gamma = 0.01$		
	$1 - \alpha$			$1 - \alpha$			$1 - \alpha$			$1 - \alpha$		
	0.90	0.95	0.99	0.90	0.95	0.99	0.90	0.95	0.99	0.90	0.95	0.99
2	32.019	37.674	48.430	160.193	188.491	242.300	20.581	26.260	37.094	103.029	131.426	185.617
3	8.380	9.916	12.861	18.930	22.401	29.055	6.156	7.656	10.553	13.995	17.170	23.896
4	5.369	6.370	8.299	9.398	11.150	14.527	4.162	5.144	7.042	7.380	9.083	12.387
5	4.275	5.079	6.634	6.612	7.855	10.260	3.407	4.203	5.741	5.362	6.578	8.939
6	3.712	4.414	5.775	5.337	6.345	8.301	3.006	3.708	5.062	4.411	5.406	7.335
7	3.369	4.007	5.248	4.613	5.488	7.187	2.756	3.400	4.642	3.859	4.728	6.412
8	3.136	3.732	4.891	4.147	4.936	6.468	2.582	3.187	4.354	3.497	4.285	5.812
9	2.967	3.532	4.631	3.822	4.550	5.966	2.454	3.031	4.143	3.241	3.972	5.389
10	2.839	3.379	4.433	3.582	4.265	5.594	2.355	2.911	3.981	3.048	3.738	5.074
11	2.737	3.259	4.277	3.397	4.045	5.308	2.275	2.815	3.852	2.898	3.556	4.829
12	2.655	3.162	4.150	3.250	3.870	5.079	2.210	2.736	3.747	2.777	3.410	4.633
13	2.587	3.081	4.044	3.130	3.727	4.893	2.155	2.671	3.659	2.677	3.290	4.472
14	2.529	3.012	3.955	3.029	3.608	4.737	2.109	2.615	3.585	2.593	3.189	4.337
15	2.480	2.954	3.878	2.945	3.507	4.605	2.068	2.566	3.520	2.522	3.102	4.222
16	2.437	2.903	3.812	2.872	3.421	4.492	2.033	2.524	3.464	2.460	3.028	4.123
17	2.400	2.858	3.754	2.808	3.345	4.393	2.002	2.486	3.414	2.405	2.963	4.037
18	2.366	2.819	3.702	2.753	3.279	4.307	1.974	2.453	3.370	2.357	2.905	3.960
19	2.337	2.784	3.656	2.703	3.221	4.230	1.949	2.423	3.331	2.314	2.854	3.892
20	2.310	2.752	3.615	2.659	3.168	4.161	1.926	2.396	3.295	2.276	2.808	3.832
25	2.208	2.631	3.457	2.494	2.972	3.904	1.838	2.292	3.158	2.129	2.633	3.001
30	2.140	2.549	3.350	2.385	2.841	3.733	1.777	2.220	3.064	2.030	2.516	3.447
35	2.090	2.490	3.272	2.306	2.748	3.611	1.732	2.167	2.995	1.957	2.430	3.334
40	2.052	2.445	3.213	2.247	2.677	3.518	1.697	2.126	2.941	1.902	2.364	3.249
45	2.021	2.408	3.165	2.200	2.621	3.444	1.669	2.092	2.898	1.857	2.312	3.180
50	1.996	2.379	3.126	2.162	2.576	3.385	1.646	2.065	2.863	1.821	2.269	3.125
60	1.958	2.333	3.066	2.103	2.506	3.293	1.609	2.022	2.807	1.764	2.202	3.038
70	1.929	2.299	3.021	2.060	2.454	3.225	1.581	1.990	2.765	1.722	2.153	2.974
80	1.907	2.272	2.986	2.026	2.414	3.173	1.559	1.965	2.733	1.688	2.114	2.924
90	1.889	2.251	2.958	1.999	2.382	3.130	1.542	1.944	2.706	1.661	2.082	2.883
100	1.874	2.233	2.934	1.977	2.355	3.096	1.527	1.927	2.684	1.639	2.056	2.850
150	1.825	2.175	2.859	1.905	2.270	2.983	1.478	1.870	2.611	1.566	1.971	2.741
200	1.798	2.143	2.816	1.865	2.222	2.921	1.450	1.837	2.570	1.524	1.923	2.679
250	1.780	2.121	2.788	1.839	2.191	2.880	1.431	1.815	2.542	1.496	1.891	2.638
300	1.767	2.106	2.767	1.820	2.169	2.850	1.417	1.800	2.522	1.476	1.868	2.608
∞	1.645	1.960	2.576	1.645	1.960	2.576	1.282	1.645	2.326	1.282	1.645	2.326

Fuente: Walpole, Myers, Myers, & Ye (2012)

ANEXO 3

Resultados de análisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción para muestras de superficies.

Resultados de analisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 1																						
MANOS											MESAS METÁLICAS											
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
0,00	0	0,00	0,0	0,00	0,30	0,09	3,259	4,277	1	1	0,00	0	0,00	0,0	0,00	0,00	0,00	3,259	4,277	0	0	
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	1	1,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

Resultados de analisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 1																						
BANDAS											MANDIL PLÁSTICO											
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	
	800	410,00	1,5									0	0,00	0,0								
	1000	610,00	2,3									1	1,00	0,0								
	600	210,00	0,8									7	7,00	0,0								
	120	270,00	1,0									0	0,00	0,0								
	210	180,00	0,7									0	0,00	0,0								
390,00	60	330,00	1,2	270,00	325,71	444,55	3,259	4,277	1506	1838	0,00	1	1,00	0,0	0,00	2,17	1,09	3,259	4,277	8	10	
	700	310,00	1,1									0	0,00	0,0								
	120	210,00	1,0									0	1,00	0,0								
	690	300,00	1,1									0	0,00	0,0								
	390	0,00	0,0									3	3,00	0,0								
	200	190,00	0,7									0	0,00	0,0								

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

Resultados de analisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 1																						
BANDEJAS PLASTICAS											FICHAS DE IDENTIFICACIÓN DE BANDEJAS											
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	
	7	3,50	2,3									1	1,00	0,0								
	6	2,50	1,7									0	0,00	0,0								
	5	1,50	1,0									0	0,00	0,0								
	20	16,50	11,0*									1	1,00	0,0								
	3	0,50	0,3									0	0,00	0,0								
3,50	6	2,50	1,7	1,50	1,79	4,10	3,379	4,433	10	12	0,00	0	0,00	0,0	0,00	0,40	0,18	3,259	4,277	2	2	
	3	0,50	0,3									0	0,00	0,0								
	2	4,50	1,0									0	0,00	0,0								
	4	0,50	0,3									0	0,00	0,0								
	3	0,50	0,3									0	0,00	0,0								
	2	1,50	1,0									0	0,00	0,0								

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

Resultados de analisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 1																						
CUCHILLOS											CANASTAS DE COLOCAR PESCADO											
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	
	0	0,00	0,0									1	1,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
0,00	0	0,00	0,0	0,00	0,30	0,09	3,259	4,277	1	1	0,00	0	0,00	0,0	0,00	0,30	0,09	3,259	4,277	1	1	
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	1	1,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

Resultados de análisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 2																						
COCHES METÁLICOS											PLATOS DE BALANZAS											
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	1	1,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
0,00	0	0,00	0,0	0,00	0,40	0,18	3,259	4,277	2	2	0,00	0	0,00	0,0	0,00	0,30	0,09	3,259	4,277	1	1	
	1	1,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

Resultados de análisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 2																					
LAMINAS DE COCHES											BOTONERAS										
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0							
	3	3,00	0,0									0	0,00	0,0							
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0							
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0							
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0							
0,00	0	0,00	0,0	0,00	0,92	0,36	3,259	4,277	3	4	0,00	0	0,00	0,0	0,00	0,00	0,00	3,259	4,277	0	0
	1	1,00	0,0									0	0,00	0,0							
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0							
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0							
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0							
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0							

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

Resultados de analisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 2										
BANDA DE EQUIPO DETECTOR DE METALES										
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.
	4	2,00	0,7							
	2	4,00	1,3							
	7	1,00	0,3							
	6	0,00	0,0							
	8	2,00	0,7							
6,00	1	5,00	1,7	3,00	4,54	5,27	3,259	4,277	20	25
	6	0,00	0,0							
	0	5,00	2,0							
	15	9,00	3,0							
	0	6,00	2,0							
	9	3,00	1,0							

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

Resultados de analisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 3																						
PISOS											DRENAJES											
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	
	4	0,00	0,0										23	9,00	1,0							
	3	1,00	0,3										7	7,00	0,8							
	7	3,00	1,0										4	10,00	1,1							
	6	2,00	0,7										25	11,00	1,2							
	6	2,00	0,7										36	22,00	2,4							
4,00	1	3,00	1,0	3,00	2,93	3,82	3,259	4,277	13	16	14,00	25	11,00	1,2	9,00	9,46	16,73	3,259	4,277	48	57	
	7	3,00	1,0										11	3,00	0,3							
	1	2,00	1,0										14	25,00	0,0							
	7	3,00	1,0										15	1,00	0,1							
	0	4,00	1,3										13	1,00	0,1							
	0	4,00	1,3										11	3,00	0,3							

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

Resultados de analisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 3																						
BASE DONDE SE PARA EL PERSONAL											PAREDES											
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	
	85	53,00	2,9									0	0,00	1,0								
	62	30,00	1,7									0	0,00	0,8								
	26	6,00	0,3									1	1,00	1,1								
	56	24,00	1,3									0	0,00	1,2								
	51	19,00	1,1									0	0,00	2,4								
32,00	15	17,00	0,9	18,00	25,30	40,09	3,259	4,277	123	148	0,00	0	0,00	1,2	0,00	0,30	0,09	3,259	4,277	1	1	
	68	36,00	2,0									0	0,00	0,3								
	13	4,00	1,1									0	0,00	0,0								
	14	18,00	1,0									0	0,00	0,1								
	19	13,00	0,7									0	0,00	0,1								
	32	0,00	0,0									0	0,00	0,3								

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

Resultados de analisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 3																					
ZÓCALOS											BANDA DEL DESPERDICIO										
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.
	0	0,00	0,0																		
	0	0,00	0,0																		
	0	0,00	0,0																		
	0	0,00	0,0																		
	0	0,00	0,0																		
0,00	0	0,00	0,0	0,00	0,00	0,00	3,259	4,277	0	0	13,00	13	0,00	0,0	7,00	7,66	13,73	3,259	4,277	39	46
	0	0,00	0,0																		
	0	0,00	0,0																		
	0	0,00	0,0																		
	0	0,00	0,0																		
	0	0,00	0,0																		
	0	0,00	0,0																		

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

Resultados de analisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 3																						
SELLADORAS						BALANZAS DE PISO																
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	
	0	0,00	0,0									3	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									46	0,00	14,3*								
	0	0,00	0,0									5	1,00	0,7								
	0	0,00	0,0									12	0,00	3,0								
	0	0,00	0,0									11	0,00	2,7								
0,00	0	0,00	0,0	0,00	0,00	0,00	3,259	4,277	0	0	3,00	16	0,00	4,3	3,00	6,09	4,70	3,379	4,433	25	32	
	0	0,00	0,0									0	0,00	1,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	1,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	1,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	1,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	1,0								

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

Resultados de analisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 3										
BOTAS										
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.
	4	8,00	2,7					4,277		
	2	10,00	3,3							
	1	11,00	3,7							
	7	5,00	1,7							
	12	0,00	0,0							
12,00	13	1,00	0,3	3,00	6,01	9,18	3,259		29	35
	15	3,00	1,0							
	2	3,00	3,3							
	15	3,00	1,0							
	14	2,00	0,7							
	16	4,00	1,3							

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{x} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

Resultados de analisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 4																						
BANDAS ÁREAS DE ENLATADO											BANDAS ÁREAS DE PREPARACIÓN											
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	
	0	2,00	1,0									3	0,00	0,0								
	3	1,00	0,5									21	18,00	9,0*								
	2	0,00	0,0									2	1,00	0,5								
	5	3,00	1,5									3	0,00	0,0								
	0	2,00	1,0									11	8,00	4,0								
2,00	11	9,00	4,5	2,00	1,66	2,73	3,259	4,277	8	10	3,00	2	1,00	0,5	2,00	3,12	3,80	3,379	4,433	14	18	
	3	1,00	0,5									1	2,00	1,0								
	2	11,00	0,0									3	2,00	0,0								
	1	1,00	0,5									7	4,00	2,0								
	0	2,00	1,0									5	2,00	1,0								
	3	1,00	0,5									1	2,00	1,0								

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

Resultados de analisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 4																						
PISO AREA DE PREPARACIÓN											PISO ENLATADO											
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	
	120	180,00	1,50									0	3,50	1,4								
	140	160,00	1,33									12	8,50	3,4								
	300	0,00	0,00									7	3,50	1,4								
	420	120,00	1,00									6	2,50	1,0								
	80	220,00	1,83									4	0,50	0,2								
300,00	230	70,00	0,58	120,00	224,68	251,00	3,379	4,433	1010	1212	3,50	3	0,50	0,2	2,50	3,66	4,60	3,379	4,433	17	21	
	900	600,00	5,00*									8	4,50	1,8								
	210	140,00	0,75									1	0,50	1,0								
	300	0,00	0,00									30	26,50	10,6*								
	410	110,00	0,92									2	1,50	0,6								
	300	0,00	0,00									3	0,50	0,2								

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

Resultados de analisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 4																						
PISO AREA DE POUCH											PISO TUNELES DE CONGELACIÓN											
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	
	1	2,00	1,0									4	1,50	1,0								
	7	4,00	2,0									3	0,50	0,3								
	5	2,00	1,0									2	0,50	0,3								
	3	0,00	0,0									12	9,50	6,3*								
	1	2,00	1,0									1	1,50	1,0								
3,00	3	0,00	0,0	2,00	3,53	3,70	3,379	4,433	16	19	2,50	3	0,50	0,3	1,50	1,69	2,20	3,379	4,433	8	10	
	1	2,00	1,0									0	2,50	1,7								
	27	27,00	12,0*									0	0,50	1,7								
	12	9,00	4,5									3	0,50	0,3								
	3	0,00	0,0									5	2,50	1,7								
	1	2,00	1,0									1	1,50	1,0								

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

ANEXO 4

RESULTADOS DE ANÁLISIS, RECONOCIMIENTO DE VALORES ATÍPICOS Y LÍMITES DE ALERTA Y LÍMITES DE ACCIÓN

PARA MUESTRAS DE AIRE.

Resultados de analisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 1 - ZONA 2 - ZONA 3																						
AMBIENTE MESA DE LIMPIEZA DE PESCADO Y EMPAQUE						AMBIENTE AREA DE ENFRIADO																
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.	
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
0,00	0	0,00	0,0	0,00	0,00	0,00	3,259	4,277	0	0	0,00	0	0,00	0,0	0,00	0,00	0,00	3,259	4,277	0	0	
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								
	0	0,00	0,0									0	0,00	0,0								

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

Resultados de analisis, reconocimiento de valores atípicos y límites de alerta y límites de acción.

ZONA 1 - ZONA 2 - ZONA 3										
AMBIENTE AREA DE ACONDICIONAMIENTO										
M.R.	R	V.A.D	R.C.V.A	M.V.A.D	s	\bar{X}	k N.C 95%	k N.C 99%	L.A	L. ACC.
	1	1,00	0,0			0,55				
	1	1,00	0,0							
	0	0,00	0,0							
	0	0,00	0,0							
	0	0,00	0,0							
0,00	1	1,00	0,0	0,00	0,93		3,259	4,277	4	5
	3	3,00	0,0							
	0	1,00	0,0							
	0	0,00	0,0							
	0	0,00	0,0							
	0	0,00	0,0							

Nota: Fuente .autor de la investigación.

^a M.R= mediana de resultados; R= Resultados en UFC /cm² para superficies y en UFC /100 mL para ambientes; V.A.D= Valor absoluto que resulta de la diferencia entre M.R y R; R.C.V.A= Resultado del cálculo del valor atípico; M.V.A.D= Mediana de los valores absolutos que resultaron de la diferencia de M.R y R; \bar{X} = Media muestral; s= Desviación estándar; k N.C= Constante para 10 muestras es 3,379 y para 11 muestras es 3,259 con un nivel de confiabilidad del 95%; k N.C= Constante para 10 muestras es 4,433 y para 11 muestras es 4,277 con un nivel de confiabilidad del 99%; L.A.= Límite de alerta; L. ACC.=Límite de acción.

^b*= Dato atípico cuando es > 4,5.

ANEXO 5

Toma de muestras en superficies



ANEXO 6

Toma de muestras de aire con equipo MAS 100 marca Merck

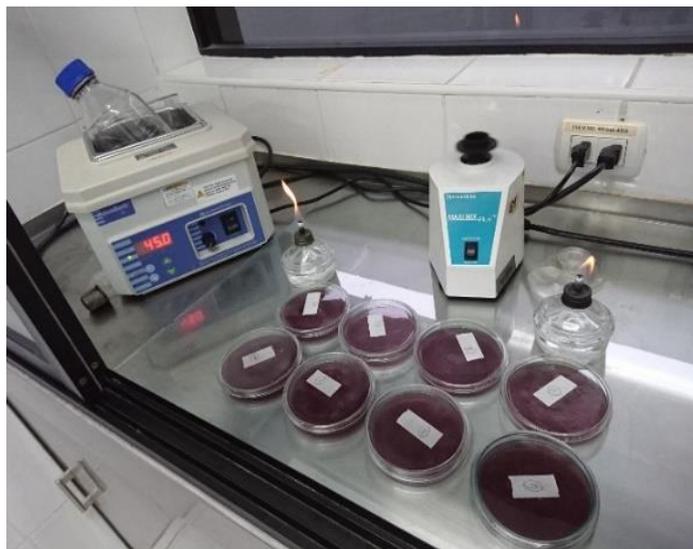




ANEXO 7

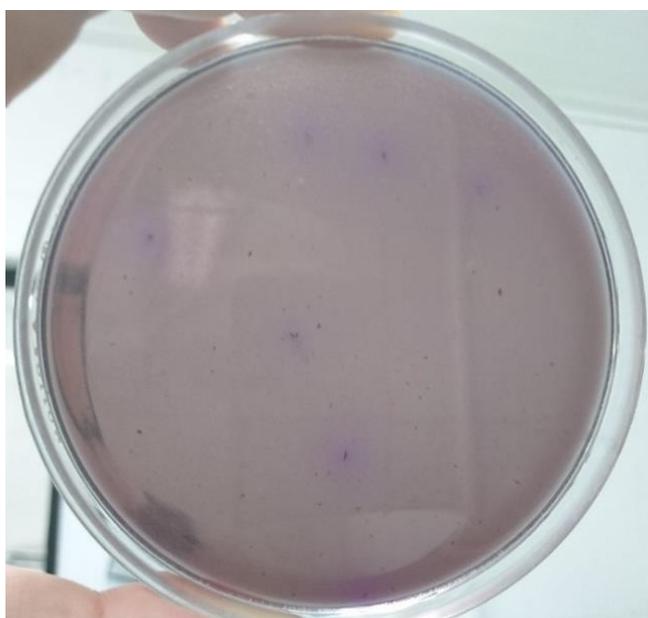
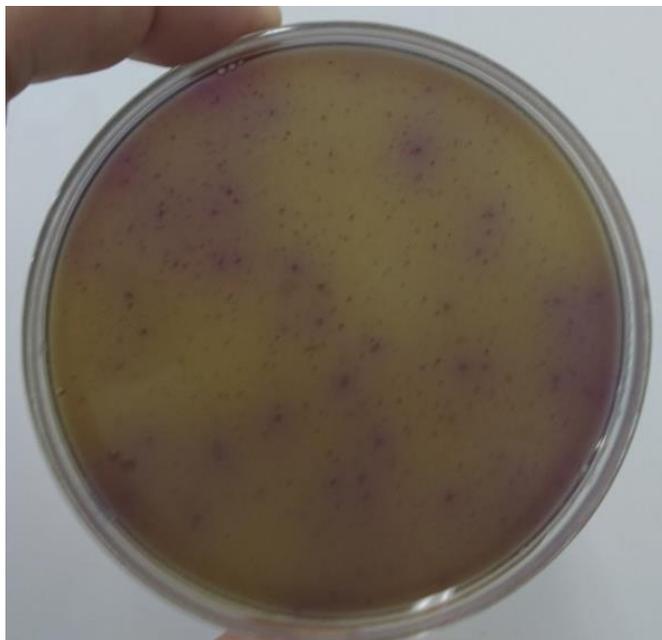
Proceso de análisis de bacterias formadoras de histamina en superficies

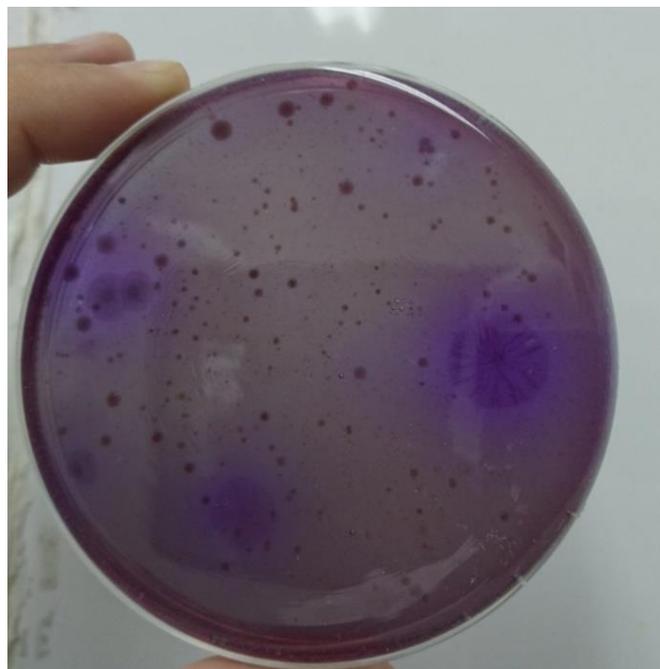




ANEXO 8

Colonias presuntivas para bacterias formadoras de histamina, con halo color purpura





ANEXO 9

Caldo modificado de Niven's, resultado positivo para bacterias formadoras de histamina, el medio se torna color purpura y hay formación de gas



ANEXO 10

Caldo modificado de Niven´s, resultado negativo para bacterias formadoras de histamina, el medio mantiene su tonalidad verdosa y no hay formación de gas

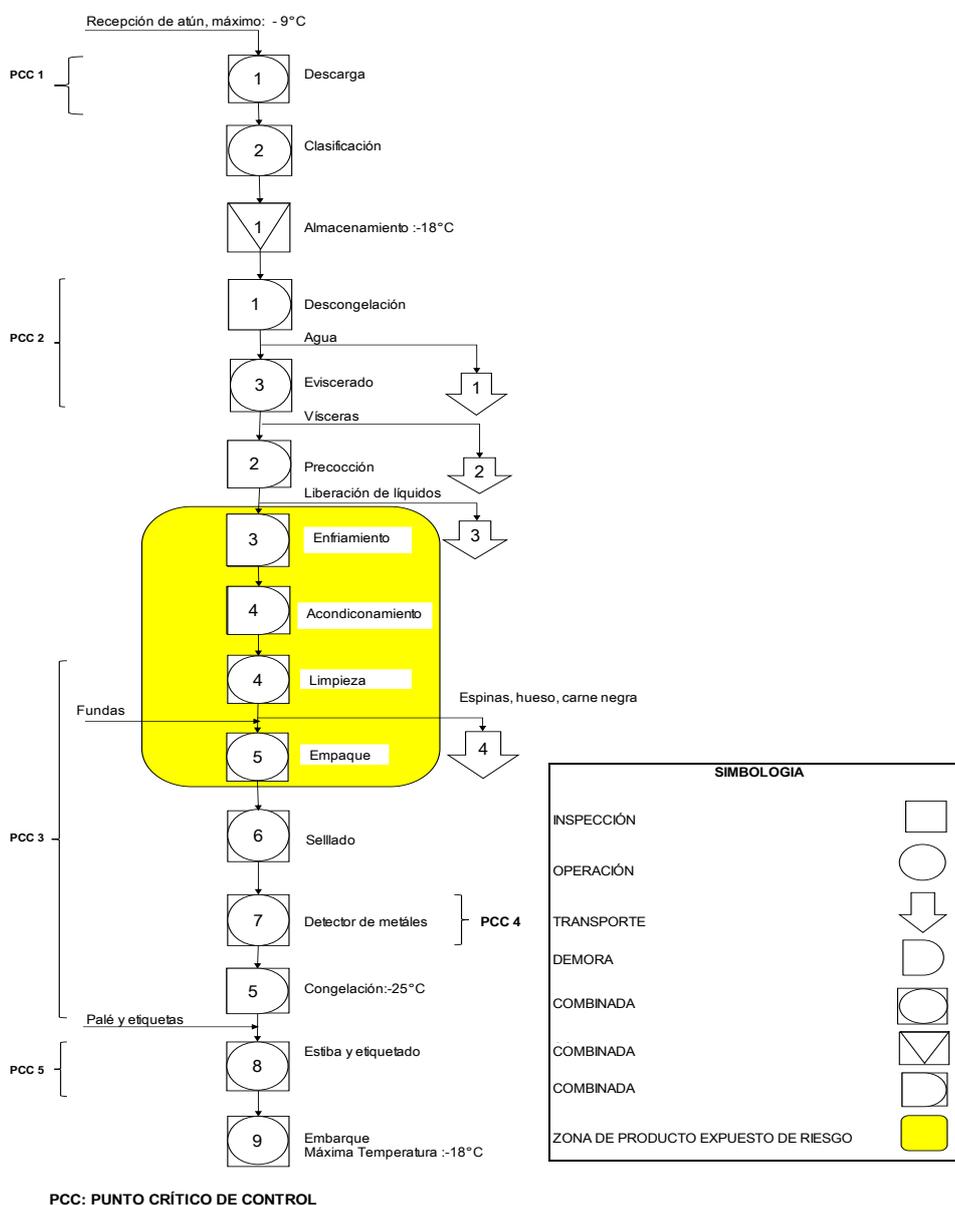


ANEXO 11

PROGRAMA DE VIGILANCIA AMBIENTAL PARA BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA DE LINEA DE ATUN PRECOCIDO CONGELADO DE LA EMPRESA MARBELIZE S.A.

1.- ZONA DE PRODUCTO EXPUESTO DE RIESGO.

La zona de producto expuesto de riesgo corresponde a la etapa de: enfriamiento, acondicionamiento, limpieza y empaque. El reconocimiento de la zona de producto expuesto se realizó en función de lo indicado por (International Commission on Microbiological Specifications for Foods [ICMSF], 2018)



2.- MICROORGANISMOS DE DESCOMPOSICIÓN EN ATÚN

En el caso del atún las bacterias más importantes que ocasionan deterioro o descomposición, producen la enzima histidina descarboxilasa que actúa sobre la histidina libre del músculo del pescado formando la toxina llamada histamina, (Lakshmanan, 2000). Este grupo de bacterias se puede analizar usando el medio de Niven et al, (1981) y modificado por Mavromatis & Quantick (2002); Guillén et al. (2004) y confirmando las colonias con el caldo modificado de Niven's (Moreira, 2018)

3.- MÉTODO DE ANALISIS DE LAS BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA

3.1 -Procedimiento para la toma de muestras en superficies.

El procedimiento para la toma de muestras en superficies sigue metodología de la norma ISO 18593 Microbiología de la cadena alimentaria Métodos horizontales para toma de muestras de superficies

3.1.1.- Medios de cultivo y reactivos para toma muestras en superficies:

Diluyente, el diluyente va a ser agua de peptona tamponada estéril.

Neutralizantes, debido al uso principalmente de hipoclorito de sodio como agente sanitizante donde se realiza el estudio, se toma en cuenta la adición de un agente neutralizante que consta de la siguiente composición: tiosulfato sódico, entre 3 g/l y 20 g/l, más polisorbato 80, 30 g/l y lecitina, 3 g/l.

3.1.2.- Procedimiento usando hisopos humedecidos, para utilizar un hisopo humedecido, se retira el hisopo de su envoltorio estéril y se humedece la punta sumergiéndola en un tubo que contenga el diluyente/neutralizante. Se presiona la punta del hisopo contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de diluyente/neutralizante. Se coloca la punta del hisopo sobre la superficie que se

va a examinar y se frota un área estimada de 100 cm², mientras se hace rotar el mango del hisopo entre el pulgar y el índice. En el caso de superficies planas, la toma de muestras se debe realizar en dirección vertical y horizontal, por ejemplo 10 veces en cada dirección.

El hisopo se devuelve al tubo con diluyente/neutralizante. Se comprueba que el tubo queda cerrado de forma que el hisopo permanezca húmedo hasta el análisis.

Se añade una cantidad suficiente de medio de enriquecimiento/diluyente para cubrir el hisopo, para el estudio se uso 10 mL en los hisopos que se usan el muestreo y 9 mL para realizar las diluciones. El contenido se homogeneiza exhaustivamente usando el vórtex.

En el caso de los recuentos, esta preparación representa la suspensión inicial. Para el recuento de los microorganismos que se van a analizar en el laboratorio, debe utilizarse la suspensión inicial y diluciones decimales adicionales para determinar el número de microorganismos.

3.1.3.- Cálculos y expresión de los resultados:

Se calcula el número de UFC en relación a la superficie de la que se han recogido las muestras por centímetro cuadrado, utilizando la fórmula:

$$Ns = \frac{N \times F}{A} \times D$$

Donde

Ns es el resultado del análisis en UCF / cm²

N es el número de ufc en 1 mL del medio de dilución (o del líquido neutralizante);

F es la cantidad del medio de dilución (o del líquido neutralizante) presente en el tubo o en la bolsa de homogeneización, en mililitros;

A es la superficie muestreada, por ejemplo, en centímetros cuadrados (**A** es igual a 1 cuando el área no se puede medir);

D es el recíproco de la dilución utilizada.

3.2 -Procedimiento para la preparación del medio de cultivo para el analisis de bacterias formadoras de histamina.

A continuación se detalla la composición del agar modificado de Niven´s y el caldo modificado de Niven´s:

Agar propuesto por Niven et al. (1981) con modificaciones

Componentes	Número CAS	Porcentaje de participación
Triptona.	91079-40-2	0,5
Extracto de levadura.	8913-01-02	0,5
L-histidina HCl H ₂ O.	5934-29-2	2,0
Cloruro de sodio (NaCl).	7647-14-5	0,5
Carbonato de Calcio (CaCO ₃).	471-34-1	0,1
Agar.	9002-18-0	3,0
Purpura de Bromocresol.	111-40-2	0,02

Nota. Fuente: Adaptado de Mavromatis & Quantick (2002); Guillén et al. (2004)

Caldo de Niven´s, modificado

Componentes	Número CAS	Porcentaje de participación
Triptona.	91079-40-2	0,50
Extracto de levadura.	8013-01-02	0,50
L-histidina HCl H ₂ O.	5934-29-2	2,70
Cloruro de sodio (NaCl).	7647-14-5	0,50
Purpura de Bromocresol.	111-40-2	0.02

Nota. Fuente: Adaptado de Moreira (2018)

Para preparar el agar modificado de Niven´s se disuelven todos los ingredientes de acuerdo a la cantidad de agar que se requiere preparar en función de las muestras que se analizarán, una vez diluido los componentes se realiza el ajuste del pH a 5,3 el cuál se lo realiza con hidróxido de sodio uno molar. Una vez ajustado el pH, se esteriliza en una autoclave a 121°C por 15 minutos. Se mantiene el agar en baño maria a 45°C para que no se solidifique.

Para el caso de las muestras de superficies las diluciones decimales se preparan desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁵ y se coloca 1 mL de estas diluciones en una caja petri

estéril, se agrega 10 mL del agar modificado de Niven´s y se deja solidificar el agar, posterior se adiciona 5 mL del mismo medio que suprimirán las colonias en expansión y por segunda vez se deja solidificar el agar, las placas con el agar solidificado se colocarán en incubación a 35°C por 48 horas. Las colonias de las bacterias formadoras de histamina presentaron un halo de color purpura, se consideró el contaje que presentó un máximo de 80 colonias por dilución que evitará contar falsos positivos presuntivos.

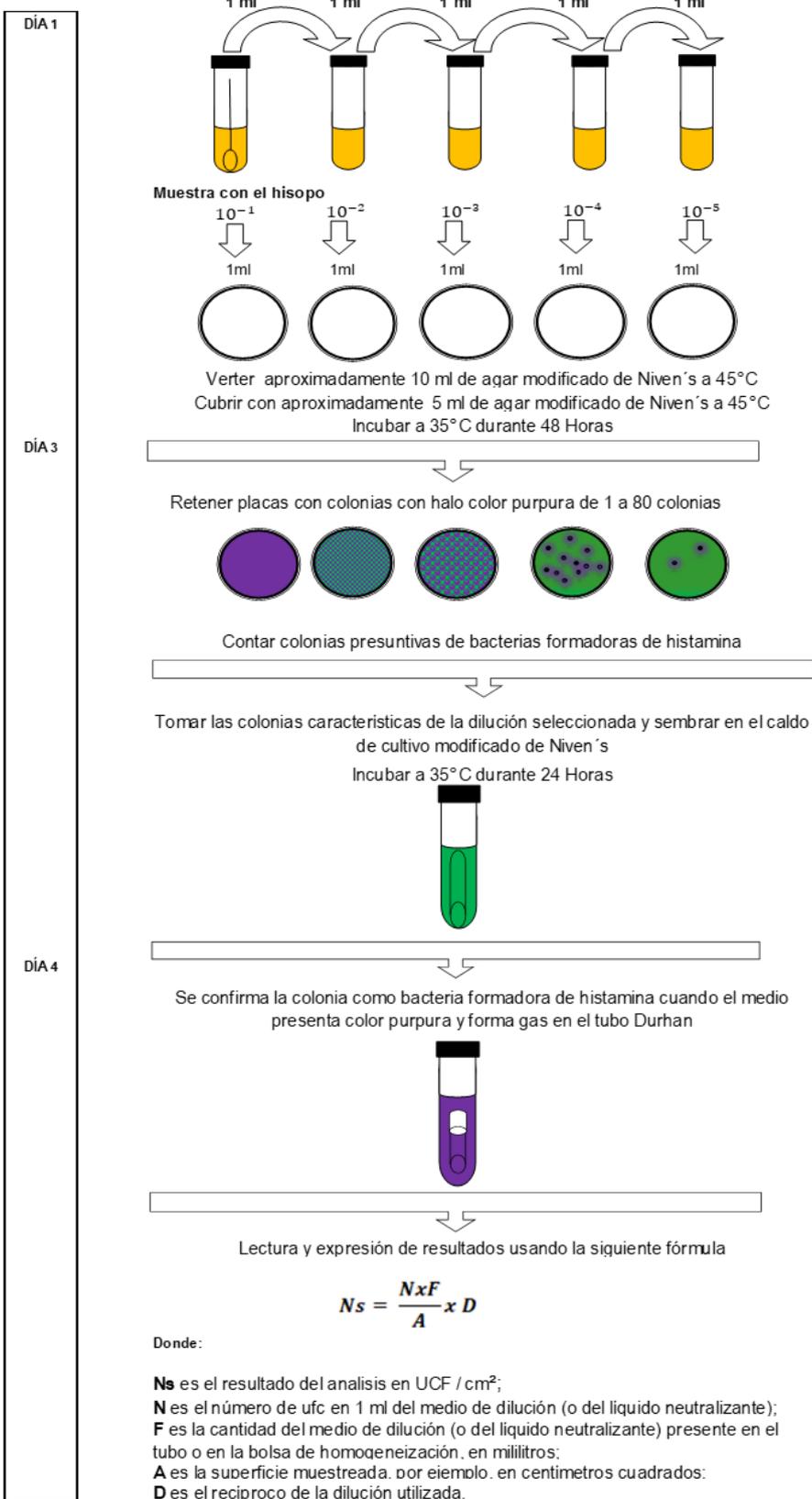
Para confirmar las colonias presuntivas positivas aisladas en el agar modificado de Niven´s, se inocula las colonias que presentan halo color purpura en tubos que contenían caldo modificado de Niven´s, con un tubo invertido de Durham.

Se calcula el número de UFC en relación a la dilución de la muestra de superficie que se escogió de acuerdo a 3.1.

A continuación se detalla imagen ilustrativa de como se realiza el proceso de analisis de bacterias formadoras de histamina para muestras de superficies usando el agar modificado de Niven´s modificado por Mavromatis & Quantick (2002); Guillén et al. (2004) y el caldo modificado de Niven´s usado por Moreira (2018)

MÉTODO PARA REALIZAR ANALISIS DE BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA EN SUPERFICIES

Basado en: Agar modificado de Niven's según Mavromatis & Quantick (2002); Guillén et al. (2004) y caldo modificado de Niven's según Moreira, (2018)



3.3 -Procedimiento para la toma de muestras de aire.

Para el caso de método de siembra de muestras de aire se debe usar el equipo **MAS 100 (Merck)**, el cual se debe configurar con un volumen de muestreo de aire de 100 litros, debido a que 1000 litros de aire saturan las placas y se hace difícil el conteo y aislamiento de las colonias.

Dentro del equipo se coloca una placa petri de 90 mm de diámetro que contiene un aproximado de 15 mL de agar de modifico de Niven's previamente esterilizado y en estado sólido. Una vez que se recolecta la muestra se lleva al laboratorio de microbiología y se realiza la incubación a 35°C por 48 horas, se realiza el conteo de las colonias que presentan un halo color púrpura consideradas presuntivas, cada colonia presuntiva debe ser inoculada en un tubo de ensayo que contenga el caldo modificado de Niven's y un tubo de fermentación Durham, se procede a la incubación de 24 horas a 35°C y se considera positivo aquel tubo que presenta el contenido color púrpura, con formación de gas, los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias (UFC) en 100 litros de aire, es decir UFC/ 100 L

El conteo de cada colonia positiva en el agar modificado de Niven's se consideran presuntivas, cada colonia identificada tiene que confirmarse con el caldo modificado de Niven's.

A continuación se detalla imagen ilustrativa de como se realiza el proceso de analisis de bacterias formadoras de histamina para muestras de aire usando el agar modificado de Niven's modificado por Mavromatis & Quantick (2002); Guillén et al. (2004) y el caldo modificado de Niven's usado por Moreira (2018)

4.- PUNTOS DE MUESTREO POR ZONA Y LÍMITES DE CONTROL DE BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA

A continuación, se detalla los puntos de muestreos por zona de riesgo y los límites de control que están divididos en límites de alerta y límites de acción.

Intervalos de tolerancias para bacterias formadoras de histamina en superficies

Categorización de zona	Descripción de muestras	Código asignado	Límites de alerta UFC/cm ²	Límites de acción UFC/cm ²
Zona 1	Manos	Z11	1	1
	Mesas metálicas	Z12	0	0
	Bandas	Z13	1506	1838
	Mandiles plásticos	Z14	8	10
	Bandejas plásticas	Z15	10	12
	Fichas de identificación de bandejas	Z16	2	2
	Cuchillos	Z17	1	1
Zona 2	Canastas de colocar pescado	Z18	1	1
	Coches metálicos	Z21	2	2
	Plato de balanza	Z22	1	1
	Lámina de coches metálicos	Z23	3	4
	Botoneras	Z24	0	0
Zona 3	Banda de equipo detector de metales	Z25	20	25
	Pisos	Z31	13	16
	Drenajes	Z32	48	57
	Bases donde se para el personal	Z33	123	148
	Paredes	Z34	1	1
	Zócalos	Z35	0	0
	Banda de desperdicio	Z36	39	46
	Selladoras	Z37	0	0
	Balanzas de piso	Z38	25	32
	Botas	Z39	29	35
Zona 4	Bandas área de enlatado	Z41	8	10
	Bandas área de preparación	Z42	14	18
	Piso área de preparación	Z43	1010	1212
	Piso área de enlatado	Z44	17	21
	Piso área de pouch	Z45	16	19
	Piso área de túneles de congelación	Z46	8	10

Nota. Fuente: Autor de la investigación

Intervalos de tolerancias para bacterias formadoras de histamina en aire

Ambientes				
Categorización de zona	Descripción de muestras	Código asignado	Límites de alerta UFC/100L	Límites de acción UFC/100L
Zona 1 - Zona 2 - Zona 3	Ambientes mesas de limpieza de pescado	Z123A	0	0
	Ambientes área de enfriado	Z123B	0	0
	Ambientes área de acondicionamiento	Z123C	4	5
Zona 4	Ambiente área de descongelación y eviscerado	Z4A	8	10

Nota. Fuente: Autor de la investigación

5.- FRECUENCIA DE LOS ANALISIS MICROBIOLÓGICOS DE SUPERFICIES Y AMBIENTES DE BACTERIAS FORMADORAS DE HISTAMINA.

De acuerdo al ICMSF (2018), establece que el número de muestras y la frecuencia de muestreo normalmente están determinadas por el conocimiento del proceso y su variabilidad, pero indica de forma referencial que el muestreo se puede realizar una vez por semana. Este programa de vigilancia ambiental se acoge a la referencia de un muestreo por semana.

6.- REPORTE PARA REGISTRO E INTERPRETACION DE RESULTADOS.

Los resultados se reportarán en formato que se detalla a continuación

ANEXO 12

Carta de certificación para la revisión y definición de estrategias para implementación de programa de vigilancia ambiental para bacterias formadoras de histamina en línea de atún precocido congelado de la empresa Marbelize S.A.

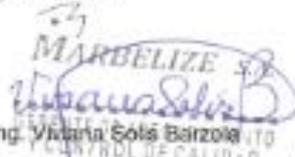
MARBELIZE S.A.

Jaramijó, 06 de Marzo del 2020

A quien corresponda,

Tengo a bien certificar que una vez que se cumpla con el proceso académico de aprobación del **Programa de vigilancia ambiental para bacterias formadoras de histamina en línea de atún precocido congelado de la empresa Marbelize S.A.**, dicho estudio será expuesto a los miembros del comité de seguridad alimentaria para definir estrategias para su implementación.

Atentamente,


Ing. Viviana Solís Barzola
Gerente Corporativo de Control y
Aseguramiento de la Calidad.