

2009-12-16

---

**MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS Y PRODUCTOS  
PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL.  
REQUISITOS GENERALES Y DIRECTRICES PARA  
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS**



E: MICROBIOLOGY OF FOOD AND ANIMAL FEEDING  
STUFFS. GENERAL REQUIREMENTS AND GUIDANCE  
FOR MICROBIOLOGICAL EXAMINATIONS

---

CORRESPONDENCIA: esta norma es una adopción idéntica  
(IDT) respecto a su documento de  
referencia, ISO 7218:2007.

---

DESCRIPTORES: microbiología de alimentos; análisis  
microbiológicos; productos lácteos;  
buenas practicas.

---

I.C.S.: 07.100.01

---

Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC)  
Apartado 14237 Bogotá, D.C. - Tel. (571) 6078888 - Fax (571) 2221435

---

Prohibida su reproducción

Primera actualización  
Editada 2009-12-24

## PRÓLOGO

El Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, **ICONTEC**, es el organismo nacional de normalización, según el Decreto 2269 de 1993.

**ICONTEC** es una entidad de carácter privado, sin ánimo de lucro, cuya Misión es fundamental para brindar soporte y desarrollo al productor y protección al consumidor. Colabora con el sector gubernamental y apoya al sector privado del país, para lograr ventajas competitivas en los mercados interno y externo.

La representación de todos los sectores involucrados en el proceso de Normalización Técnica está garantizada por los Comités Técnicos y el período de Consulta Pública, este último caracterizado por la participación del público en general.

La NTC 4092 (Primera actualización) fue ratificada por el Consejo Directivo de 2009-12-16.

Esta norma está sujeta a ser actualizada permanentemente con el objeto de que responda en todo momento a las necesidades y exigencias actuales.

A continuación se relacionan las empresas que colaboraron en el estudio de esta norma a través de su participación en el Comité Técnico 25 Microbiología.

3M COLOMBIA S.A. -DIVISIÓN MICROBIOLOGÍA-	IVONNE BERNIER LABORATORIO LTDA.
ALCALDÍA MAYOR DE BOGOTÁ - SECRETARÍA GENERAL -	KOYOMAD S.A.
DEPENDENCIA: ARCHIVO BOGOTÁ	LABFARVE -LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA VEGETAL-
ALMACENES ÉXITO S.A.	LABORATORIO EMICAL LTDA.
ALPINA -PRODUCTOS ALIMENTICIOS	LABORATORIO MICROBIOLÓGICO BARRANQUILLA LTDA.
ALPINA S.A.-	LABORATORIO MICROBIOLÓGICO ORTÍZ MARTÍNEZ LTDA.
AMFAC LABORATORIO	LABORATORIOS SFC LTDA.
ANNAR DIAGNÓSTICA IMPORT LTDA.	MEALS DE COLOMBIA
ASBIOQUIM LTDA.	MICROBIÓLOGOS ASOCIADOS LTDA.
ASINAL	MOLINOS DEL ATLÁNTICO S.A.
BIOCONTROL	NULAB LTDA.
BIOQUILAB LTDA	PRODUCTOS LÁCTEOS EL RECREO
BIOSOLUTIONS LTDA	PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE FLUIDOS
CARULLA VIVERO S.A.	LTDA.
CONGELADOS AGRÍCOLAS S.A. -	QUALA S.A.
CONGELAGRO-	TRIPLE A. S.A. E.S.P.
COOLECHERA	UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
CORPOLAC -CORPOICA-	UNIVERSIDAD LIBRE- SECCIONAL
ENZIPAN DE COLOMBIA LTDA.	BARRANQUILLA
GASEOSAS POSADA TOBÓN S.A. -	UNIVERSIDAD SIMÓN BOLÍVAR
POSTOBÓN-	
INSPECTORATE COLOMBIA LTDA.	

Además de las anteriores, en Consulta Pública el Proyecto se puso a consideración de las siguientes empresas:

ACONDESA S.A.  
CORPORACIÓN PARA EL AVANCE DE LA  
MICROBIOLOGÍA Y LA MICROSCOPIA  
MICROS  
DUPONT QUALICON  
EMPRESA DE ACUEDUCTO Y  
ALCANTARILLADO DE BOGOTÁ E.S.P.  
FABRICA DE ESPECIAS Y  
CONDIMENTOS EL REY S.A.  
INDALPE LTDA  
JOHNSON DIVERSEY

KLIK S.A  
LABORATORIO A.B.B.A.  
LABORATORIOS DECNO S.A.  
LABORATORIOS ERMA S.A.  
LESNIAK E,U.  
POSTOBÓN S.A  
UNIVERSIDAD DEL TOLIMA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
UPTC  
VITROFARMA S.A.

**ICONTEC** cuenta con un Centro de Información que pone a disposición de los interesados normas internacionales, regionales y nacionales y otros documentos relacionados.

**DIRECCIÓN DE NORMALIZACIÓN**

**CONTENIDO**

	<b>Página</b>
<b>PRÓLOGO</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.    ALCANCE .....</b>	<b>1</b>
<b>2.    REFERENCIAS NORMATIVAS .....</b>	<b>2</b>
<b>3.    INSTALACIONES.....</b>	<b>2</b>
<b>3.1    GENERALIDADES.....</b>	<b>2</b>
<b>3.2    CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD .....</b>	<b>2</b>
<b>3.3    DISEÑO DEL LABORATORIO .....</b>	<b>3</b>
<b>3.4    ÁREAS DEL LABORATORIO .....</b>	<b>3</b>
<b>3.5    DISTRIBUCIÓN Y ACCESORIOS DE LAS INSTALACIONES.....</b>	<b>4</b>
<b>3.6    LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>4.    PERSONAL .....</b>	<b>7</b>
<b>4.1    GENERALIDADES.....</b>	<b>7</b>
<b>4.2    COMPETENCIA .....</b>	<b>7</b>
<b>4.3    VERIFICACIÓN DE LA COMPETENCIA CONTINUA DEL PERSONAL.....</b>	<b>7</b>
<b>4.4    HIGIENE .....</b>	<b>7</b>
<b>5.    APARATOS Y EQUIPOS .....</b>	<b>8</b>
<b>5.1    GENERALIDADES.....</b>	<b>8</b>
<b>5.2    GABINETES PROTECTORES.....</b>	<b>9</b>

	<b>Página</b>
<b>5.3    BALANZAS Y DILUTORES GRAVIMÉTRICOS.....</b>	<b>10</b>
<b>5.4    HOMOGENIZADORES, MEZCLADORAS Y LICUADORAS .....</b>	<b>11</b>
<b>5.5    MEDIDORES DE pH .....</b>	<b>12</b>
<b>5.6    AUTOCLAVES .....</b>	<b>13</b>
<b>5.7    PREPARADORES DE MEDIOS .....</b>	<b>15</b>
<b>5.8    INCUBADORAS .....</b>	<b>15</b>
<b>5.9    REFRIGERADORES, CUARTOS PARA ALMACENAMIENTO EN FRÍO .....</b>	<b>17</b>
<b>5.10    CONGELADORES Y CONGELADORES DE TEMPERATURA ULTRA BAJA.....</b>	<b>17</b>
<b>5.11    BAÑOS CONTROLADOS TERMOSTÁTICAMENTE.....</b>	<b>18</b>
<b>5.12    VAPORIZADORES, INCLUYENDO BAÑOS DE AGUA EN EBULLICIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>5.13    HORNOS DE ESTERILIZACIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>5.14    HORNOS DE MICROONDAS .....</b>	<b>21</b>
<b>5.15    LAVADORAS PARA CRISTAL .....</b>	<b>22</b>
<b>5.16    MICROSCOPIOS ÓPTICOS .....</b>	<b>23</b>
<b>5.17    QUEMADORES DE GAS O INCINERADORES TIPO ALAMBRE.....</b>	<b>23</b>
<b>5.18    DISPENSADORES PARA MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>5.19    MEZCLADORES DE VÓRTICE .....</b>	<b>25</b>
<b>5.20    DISPOSITIVOS PARA RECuento DE COLONIAS .....</b>	<b>25</b>
<b>5.21    EQUIPOS PARA CULTIVO EN UNA ATMÓSFERA MODIFICADA .....</b>	<b>26</b>
<b>5.22    CENTRÍFUGAS .....</b>	<b>27</b>
<b>5.23    PLACA TÉRMICA Y MANTILLA DE CALEFACCIÓN .....</b>	<b>27</b>
<b>5.24    DISPENSADORES EN ESPIRAL .....</b>	<b>28</b>
<b>5.25    DESTILADORES, DESIONIZADORES Y UNIDADES DE ÓSMOSIS INVERSA.....</b>	<b>29</b>

	<b>Página</b>
5.26	<b>CRONÓMETROS Y DISPOSITIVOS DE TIEMPO.....29</b>
5.27	<b>PIPETAS Y PIPETEADORES .....30</b>
5.28	<b>TERMÓMETROS Y DISPOSITIVOS PARA MONITOREO DE TEMPERATURA, INCLUYENDO REGISTRADORES AUTOMÁTICOS.....31</b>
5.29	<b>SEPARADOR INMUNOMAGNÉTICO .....32</b>
5.30	<b>SISTEMA DE FILTRACIÓN .....33</b>
5.31	<b>OTRO EQUIPO Y SOFTWARE.....33</b>
6.	<b>PREPARACIÓN DE LA VIDRIERIA Y DE OTROS MATERIALES DE LABORATORIO .....33</b>
6.1	<b>PREPARACIÓN .....33</b>
6.2	<b>ESTERILIZACIÓN/DESCONTAMINACIÓN.....34</b>
6.3	<b>EQUIPO Y MATERIALES DESECHABLES .....34</b>
6.4	<b>ALMACENAMIENTO DE LA VIDRIERIA Y LOS MATERIALES LIMPIOS.....34</b>
6.5	<b>MANEJO DE VIDRIERIA Y MATERIALES ESTÉRILES.....34</b>
6.6	<b>USO DE LA DESCONTAMINACIÓN Y LA DESINFECCIÓN.....35</b>
6.7	<b>MANEJO DE RESIDUOS.....35</b>
6.8	<b>LAVADO .....36</b>
7.	<b>PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....36</b>
8.	<b>MUESTRAS DE LABORATORIO .....36</b>
8.1	<b>MUESTREO.....36</b>
8.2	<b>TRANSPORTE .....37</b>
8.3	<b>RECIBO .....37</b>
8.4	<b>ALMACENAMIENTO .....38</b>

	<b>Página</b>
<b>8.5    PORCIÓN DE ENSAYO .....</b>	<b>39</b>
<b>9.     ANÁLISIS .....</b>	<b>39</b>
<b>9.1    PRECAUCIONES HIGIÉNICAS DURANTE EL ANÁLISIS .....</b>	<b>39</b>
<b>9.2    PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN INICIAL Y LAS DILUCIONES .....</b>	<b>41</b>
<b>10.    ENUMERACIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>10.1   GENERALIDADES.....</b>	<b>42</b>
<b>10.2   ENUMERACIÓN USANDO UN MEDIO SÓLIDO .....</b>	<b>42</b>
<b>10.3   CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON EL MEDIO SÓLIDO.....</b>	<b>45</b>
<b>10.4   ENUMERACIÓN DE LEVADURAS Y MOHOS .....</b>	<b>52</b>
<b>10.5   ENUMERACIÓN UTILIZANDO UN MEDIO LÍQUIDO .....</b>	<b>52</b>
<b>11.    MÉTODO DE DETECCIÓN (MÉTODO CUALITATIVO).....</b>	<b>59</b>
<b>11.1   GENERALIDADES.....</b>	<b>59</b>
<b>11.2   PRINCIPIO.....</b>	<b>59</b>
<b>11.3   MEDICIÓN DE LA INCERTIDUMBRE .....</b>	<b>59</b>
<b>12.    MÉTODOS DE CONFIRMACIÓN .....</b>	<b>60</b>
<b>12.1   GENERALIDADES.....</b>	<b>60</b>
<b>12.2   PREPARACIÓN DE UN CULTIVO PURO .....</b>	<b>60</b>
<b>12.3   TINCIÓN DE GRAM (TÉCNICA DE HUCKER MODIFICADA).....</b>	<b>60</b>
<b>12.4   USO DE GALERÍAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN .....</b>	<b>62</b>
<b>12.5   USO DE SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN.....</b>	<b>62</b>
<b>12.6   MÉTODOS SEROLÓGICOS .....</b>	<b>63</b>

	<b>Página</b>
<b>13.    INFORME DE ENSAYO .....</b>	<b>64</b>
<b>14.    VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS .....</b>	<b>64</b>
<b>14.1   VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE REFERENCIA.....</b>	<b>64</b>
<b>14.2   VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS .....</b>	<b>64</b>
<b>14.3   VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS INTERNOS .....</b>	<b>64</b>
<b>15.    ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS/CONTROL          DE CALIDAD DEL DESEMPEÑO.....</b>	<b>65</b>
<b>15.1   CONTROL INTERNO DE LA CALIDAD .....</b>	<b>65</b>
<b>15.2   CEPAS DE REFERENCIA .....</b>	<b>65</b>
<b>15.3   EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD (ENSAYO DE SUFICIENCIA).....</b>	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>73</b>
<b>DOCUMENTO DE REFERENCIA.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS</b>	
<b>ANEXO A (Informativo) PROPIEDADES DE ALGUNOS DESINFECTANTES.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO B (Normativo) DETERMINACIÓN DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP).....</b>	<b>67</b>
<b>TABLA</b>	
<b>Tabla 1. Ejemplo de la selección de resultados positivos para el cálculo del NMP .....</b>	<b>58</b>

## **INTRODUCCIÓN**

Al realizar análisis microbiológicos, es especialmente importante que:

- únicamente se aislen y enumeren aquellos microorganismos que están presentes en las muestras;
- los microorganismos no contaminen el ambiente;

Con el fin de lograr esto, es necesario poner atención a la higiene personal y usar técnicas de trabajo que garantice, en la medida de lo posible, la exclusión de contaminación externa.

Dado que, en esta norma, es posible brindar únicamente unos pocos ejemplos de las precauciones que se deben tomar durante los análisis microbiológicos, el conocimiento completo de las técnicas microbiológicas y de los microorganismos involucrados es esencial. Es importante que los análisis se realicen de una manera lo más precisa que sea posible, incluyendo el monitoreo del registro de los aspectos que pueden afectar los resultados y los cálculos de los números de microorganismos y de la incertidumbre de los resultados.

En última instancia, es responsabilidad del jefe del laboratorio juzgar si las manipulaciones son seguras y se pueden considerar buena práctica de laboratorio.

Un gran número de manipulaciones pueden, por ejemplo, ocasionar involuntariamente la contaminación cruzada y el analista siempre debería verificar la precisión de los resultados obtenidos mediante su técnica.

Con el fin de realizar los análisis de manera correcta, es necesario tomar algunas precauciones al construir y equipar y laboratorio.

Se deben tomar algunas precauciones, no solamente por razones de higiene sino también para garantizar una buena reproducibilidad de los resultados. No es posible especificar todas las precauciones que se deben tomar en todas las circunstancias, pero esta norma por lo menos suministra las medidas principales que se deben tomar al preparar, esterilizar, almacenar los medios y utilizar el equipo.

Si se cumplen las directrices suministradas en esta norma, esto contribuirá también a mantener la salud y la seguridad del personal. La información adicional sobre este tema se encuentra en la literatura que se enumera en la sección de bibliografía.

**MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS Y PRODUCTOS PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL.  
REQUISITOS GENERALES Y DIRECTRICES PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS**

**1.    ALCANCE**

Esta norma proporciona los requisitos generales y las directrices/opciones destinadas a tres usos principales:

- implementación de las normas sobre microbiología de alimentos, lácteos y productos lácteos para la detección o enumeración de microorganismos, denominadas en adelante "normas específicas":
- buenas prácticas de laboratorio para laboratorios microbiológicos de alimentos (el propósito no es detallarlas en esta norma, existen manuales para tal fin);
- directrices para la acreditación de laboratorios microbiológicos para alimentos (esta norma describe los requisitos técnicos de acuerdo con el Anexo B de NTC/ISO 17025:2005 para la acreditación de laboratorios microbiológicos por parte de organizaciones nacionales).

Los requisitos de ésta norma reemplazan a los correspondientes de las normas específicas existentes.

Las instrucciones adicionales en el campo de los análisis de biología molecular se especifican en la norma ISO 22174.

Esta norma comprende el análisis para determinar bacterias, levaduras y mohos y se puede utilizar si se complementa con las directrices específicas para priones, parásitos y virus. Esta norma no tratará del análisis para toxinas u otros metabolitos (por ejemplo aminas) provenientes de los microorganismos.

Esta norma se aplica a microbiología de alimentos, a productos para alimentación animal, al ambiente de la producción de alimentos y al ambiente de producción primaria.

El propósito de esta norma es ayudar a garantizar la validez de los análisis microbiológicos para alimentos, ayudar a garantizar que las técnicas generales utilizadas para realizar estos análisis sean las mismas en todos los laboratorios, facilitar el logro de resultados homogéneos en diferentes laboratorios y contribuir a la seguridad del personal del laboratorio al evitar los riesgos de infección.

## **2. REFERENCIAS NORMATIVAS**

Los siguientes documentos normativos referenciados son indispensables para la aplicación de este documento normativo. Para referencias fechadas, se aplica únicamente la edición citada. Para referencias no fechadas, se aplica la última edición del documento normativo referenciado (incluida cualquier corrección).

NTC 4491 (todas sus partes), Microbiología de alimentos y alimentos para animales. preparación de muestras para ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológico.

NTC 5014, Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Protocolo para la validación de métodos alternos.

NTC 5158, Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Reacción en cadena de la polimerasa -PCR- para la detección de patógenos de alimentos. Requerimientos específicos para el método general.

GTC 78, Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Guía para la preparación y producción de medios de cultivo. Guía general para el aseguramiento de la calidad para la preparación de los medios de cultivo en el laboratorio.

DE 061-08, Calidad del agua. Guía general sobre la enumeración de microorganismos por cultivo.

ISO 835 (todas sus partes), *Laboratory Glassware. Graduated Pipettes.*

ISO 8655-1, *Piston-Operated Volumetric Apparatus. Part 1: Terminology, General Requirements and User Recommendations.*

ISO/TS 19036, *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. Guidelines for the Estimation of Measurement Uncertainty for Quantitative Determinations.*

## **3. INSTALACIONES**

### **3.1 GENERALIDADES**

Esta sección suministra los requisitos generales, por ejemplo los principios de diseño y organización, para la distribución de un laboratorio microbiológico.

El análisis de las muestras de la etapa de la producción primaria (especialmente para la recepción y la preparación de las muestras) debe ser independiente del análisis de otras muestras con el fin reducir el riesgo de contaminación cruzada.

### **3.2 CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD**

El diseño del laboratorio debe cumplir con los requisitos de seguridad, los cuales dependerán del tipo de microorganismo. Para este fin, los microorganismos se clasifican en cuatro categorías de riesgo:

- **Categoría de riesgo 1** (riesgo muy bajo o no existente para el individuo y para la comunidad).

Un microorganismo que no es probable que cause enfermedad a los humanos ni los animales.

- **Categoría de riesgo 2** (riesgo moderado para el individuo, riesgo bajo para la comunidad).

Un patógeno que puede causar enfermedad a los humanos o los animales pero que no es probable que sea un peligro grave para los trabajadores del laboratorio, la comunidad ni el ambiente. Las exposiciones en el laboratorio pueden causar infección humana grave, pero están disponibles el tratamiento eficaz y las medidas preventivas, y el riesgo de dispersión de la infección es limitado.

- **Categoría de riesgo 3** (riesgo alto para el individuo, riesgo bajo para la comunidad).

Un patógeno que usualmente causa enfermedad grave a los humanos o los animales pero que comúnmente no se propaga de un individuo infectado a otro. Están disponibles el tratamiento eficaz y las medidas preventivas.

- **Categoría de riesgo 4** (riesgo alto para el individuo y para la comunidad).

Un patógeno que usualmente causa enfermedad grave para los humanos o los animales y que se puede transmitir fácilmente de un individuo a otro, de manera directa o indirecta. Usualmente no están disponibles el tratamiento eficaz ni las medidas preventivas.

ADVERTENCIA Consulte los reglamentos nacionales que definen, en particular, la categoría de riesgo de los microorganismos que se encuentran dentro de las fronteras del país en cuestión.

### **3.3      DISEÑO DEL LABORATORIO**

Las directrices para la distribución del laboratorio que se describen a continuación, comprenden los análisis para la detección de microorganismos pertenecientes a las categorías de riesgo 1, 2 y 3 para microbiología de alimentos.

Cabe anotar que pueden ser necesarias medidas de seguridad adicionales dependiendo de la legislación local.

### **3.4      ÁREAS DEL LABORATORIO**

#### **3.4.1    Generalidades**

El laboratorio comprende áreas asociadas con las muestras y los ensayos (véase el numeral 3.4.2) y áreas generales (véase el numeral 3.4.3). Estas áreas deben ser independientes.

#### **3.4.2    Áreas asociadas con las muestras y los ensayos**

Se considera una buena práctica tener lugares independientes o áreas claramente designadas para las siguientes actividades:

- recibir y almacenar las muestras;
- preparación de muestras, en particular en el caso de materias primas (por ejemplo productos en polvo que contienen una alta cantidad de microorganismos);
- análisis de las muestras (desde la suspensión inicial), incluyendo la incubación de los microorganismos;

- manipulación de los patógenos esperados;
- almacenamiento de cepas de referencia y otras;
- preparación y esterilización de medios de cultivo y equipo;
- almacenamiento de medios de cultivo y reactivos;
- análisis de productos alimenticios para determinar la esterilidad;
- descontaminación;
- limpieza de vidriería y otros equipos;
- almacenamiento de sustancias químicas peligrosas, que se conservan preferiblemente en gabinetes, alacenas, recintos o edificaciones de diseño especial.

### **3.4.3 Áreas generales**

Se deben considerar áreas independientes para los siguientes usos:

- entradas, corredores, escaleras, ascensores;
- áreas administrativas (por ejemplo secretarías, oficinas, recintos para documentos, etc.);
- guardarropas y baños;
- cuartos de archivo;
- almacenes;

## **3.5 DISTRIBUCIÓN Y ACCESORIOS DE LAS INSTALACIONES**

### **3.5.1 Objetivos**

El objetivo es garantizar que el ambiente dentro del cual se lleven a cabo los análisis microbiológicos no afecte la confiabilidad de los resultados de ensayo.

Organice las instalaciones de modo que se evite el riesgo de contaminación cruzada. Algunas formas para lograr este objetivo son, por ejemplo:

- a) construir el laboratorio de acuerdo con el principio de distribución "sin retorno";
- b) realizar los procedimientos de manera secuencial utilizando las precauciones correspondientes para garantizar la integridad de la muestra y del ensayo (por ejemplo utilizar recipientes sellados);
- c) separar las actividades en el tiempo y el espacio.

Evite condiciones extremas tales como exceso de temperatura, polvo, humedad, vapor, ruido, vibración, etc.

El espacio debería ser suficiente para permitir que las áreas de trabajo se conserven limpias y ordenadas. El espacio requerido debería estar acorde con el volumen de los análisis que se manejan y la organización interna global del laboratorio. El espacio debería ser como el exigido por los reglamentos nacionales, cuando ellos existen.

### **3.5.2 Accesorios**

Las instalaciones para los ensayos se deberían construir y equipar de la siguiente manera con el fin de reducir el riesgo de contaminación por polvo y, por ende, por microorganismos (para microorganismos en la categoría de riesgo 3, consulte los reglamentos nacionales e internacionales).

- a) Las paredes, cielos rasos y pisos debería ser lisos, fáciles de limpiar y resistentes a los detergentes y los desinfectantes utilizados en los laboratorios.
- b) Los pisos debería ser antideslizantes.
- c) Las tuberías aéreas que transportan fluidos no deberían cruzar las instalaciones, a menos que estén encerradas herméticamente. Cualquier otra estructura aérea debería estar cubierta o tener un acceso fácil para la limpieza regular.
- d) Las ventanas y las puertas se deberían poder cerrar cuando se realizan los ensayos con el fin de minimizar las corrientes de aire. Además, se deberían diseñar para evitar la formación de trampas del polvo y facilitar su limpieza. La temperatura ambiente (18 °C a 27 °C) y la calidad del aire (contenido de microorganismos, tasa de dispersión del polvo, etc.) deberían ser compatibles con la realización de los ensayos. Para este fin se recomienda un sistema de ventilación por filtro para el aire de entrada y el aire de salida.
- e) Se recomienda instalar un sistema de extracción adecuado para evitar la exposición al polvo que se origina por la manipulación de medios de cultivo deshidratados, y muestras en polvo o cubiertas del polvo.
- f) Cuando los ensayos se van a realizar en una atmósfera con contaminación baja, la habitación debería estar equipada especialmente con un gabinete de flujo de aire laminar limpio o un gabinete de seguridad, o ambos.
- g) Si es necesario, el ambiente del laboratorio debería estar protegido contra los efectos peligrosos de la radiación solar mediante el uso de contraventanas o paneles de vidrio tratados adecuadamente. Las persianas instaladas en el interior no son adecuadas ya que dificultan la limpieza y pueden ser una fuente de polvo.

### **3.5.3 Otros puntos**

Se recomienda considerar los siguientes puntos:

- disponibilidad del suministro de agua, con una calidad adecuada para el uso previsto;
- disponibilidad de electricidad;
- disponibilidad de gas (por tuberías o en cilindros);
- iluminación adecuada en cada sección del laboratorio;

- mesones de los bancos del laboratorio y muebles elaborados en material liso e impermeable que sea fácil de limpiar y desinfectar;
- muebles del laboratorio diseñados de manera tal que se facilite la limpieza de los pisos (por ejemplo, muebles móviles);
- en las áreas de ensayo no debe haber muebles, documentos ni otros elementos diferentes de aquellos que sean estrictamente necesarios para las actividades de ensayo;
- disponibilidad de medios de almacenamiento para los documentos utilizados cuando se manipulan muestras, medios de cultivo, reactivos, etc.;
- disposición de lavamanos en cada cuarto de ensayo y, si es necesario, en las áreas generales, de preferencia cerca de la puerta;
- disposición de una autoclave para la destrucción de materiales de desecho contaminados y medios de cultivo, a menos que se tenga en el lugar un sistema adecuado para la remoción de los desechos contaminados para incineración;
- disposición de sistemas de seguridad que cubran incendios, emergencias y duchas de emergencias e instalaciones para lavado ocular;
- disposición de instalaciones de primeros auxilios.

### **3.6 LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN**

Se recomienda verificar los siguientes puntos:

- a) Pisos, paredes, cielos rasos, mesones de los bancos del laboratorio, muebles y uniones entre ellos deberían estar sometidos a mantenimiento y reparación regulares con el fin de evitar grietas que puedan actuar como fuente de contaminación.
- b) Se recomienda realizar limpieza y desinfección regulares con el fin de mantener las instalaciones en una condición adecuada para realizar los ensayos. Las superficies contaminadas o potencialmente contaminadas se deberían descontaminar utilizando un desinfectante que sea bactericida y fungicida.

NOTA 1 Las habitaciones y equipos se pueden descontaminar utilizando fumigación con vapor de formaldehído, si así lo permiten los reglamentos nacionales.

- c) Los sistemas de ventilación y sus filtros se deberían someter a mantenimiento regular y los filtros se deberían cambiar cuando sea necesario.
- d) La calidad microbiológica de las superficies de trabajo del laboratorio, las superficies de contacto con el personal y el aire se deberían monitorear con regularidad (la frecuencia depende de los resultados de ensayos previos).
- e) La contaminación superficial se puede estimar aplicando directamente a la superficie una placa de contacto que contenga agentes de neutralización adecuados contra los desinfectantes (por ejemplo, lecitina, tiosulfato de sodio). La calidad del aire se puede examinar mediante exposición durante 15 min. de una caja de Petri abierta que contenga un medio de agar no selectivo (por ejemplo agar para recuento de placa PCA) o un agar selectivo adecuado para el microorganismo objeto que se está buscando (por ejemplo, moho).

NOTA 2 También se pueden utilizar otros métodos con el fin de estimar la contaminación de las superficies y del aire. Véase la norma ISO 18593.

## **4. PERSONAL**

### **4.1 GENERALIDADES**

Los requisitos generales de la competencia del personal se pueden encontrar en NTC-ISO17025.

### **4.2 COMPETENCIA**

Para cada método o técnica, se deben definir criterios objetivos para la evaluación de la competencia adecuada, tanto inicial como continuamente.

La competencia se puede establecer dentro del laboratorio mediante el control de calidad interna (véase el numeral 15.1.2).

NOTA Uno de los medios de investigar la causa de un desempeño deficiente (pipeteo, homogeneidad deficiente de la suspensión inicial, recuento, etc.) en el caso de la enumeración mediante el recuento de las colonias se indica en las normas ISO 14461-1.

### **4.3 VERIFICACIÓN DE LA COMPETENCIA CONTINUA DEL PERSONAL**

La verificación de la competencia continua del personal se debería evaluar con regularidad frente a los parámetros objeto. Esto incluye la participación en programas de aseguramiento de la calidad interna, pruebas de competencia (véase la GTC 55-1), el uso de materiales de referencia o mediante pruebas de autoevaluación para la enumeración de microorganismos, tal como se describe en la norma ISO 14461-2.

### **4.4 HIGIENE**

Se deben tomar las siguientes precauciones de higiene personal con el fin de evitar la contaminación de las muestras y los medios de cultivo, y evitar el riesgo de infección del personal.

- a) Utilizar vestimenta de laboratorio ajustada correctamente que esté limpia y en buenas condiciones, elaborada a partir de telas que limiten los riesgos de inflamabilidad. Esta vestimenta no se debe usar fuera de las áreas de trabajo ni, en lo posible, en los guardarropas.
- b) Utilizar protección para el cabello y la barba, si es necesario para la integridad de la muestra.
- c) Mantener las uñas limpias y preferiblemente cortas.
- d) Lavar las manos exhaustivamente con agua tibia, preferiblemente suministrada por un grifo que no sea de operación manual, antes y después de los análisis microbiológicos e inmediatamente después de utilizar los baños. Use jabón líquido o en polvo o, posiblemente, un desinfectante suministrado de preferencia por un dispensador que se mantenga limpio. Para el secado de las manos, utilice toallas de papel desechables o toallas de tela desechables. Estas precauciones se aplican tanto al personal del laboratorio como a los visitantes.

- e) Cuando se trabaje con muestras, cultivos y medios expuestos y cuando se realice la inoculación, se debe evitar hablar, toser, etc.
- f) Las personas que tengan infecciones o enfermedades de la piel deben tomar precauciones cuando existe la probabilidad de que los microorganismos provenientes de ellas contaminen las muestras y puedan invalidar los resultados.
- g) No comer ni beber en el laboratorio y no poner alimentos para consumo personal en los refrigeradores o los congeladores del laboratorio.
- h) Se prohíbe utilizar las pipetas con la boca.

## **5. APARATOS Y EQUIPOS**

### **5.1 GENERALIDADES**

Según las buenas prácticas de laboratorio, todos los aparatos y equipos se deberían mantener limpios y en buenas condiciones de funcionamiento. Antes del uso, se debería verificar que el equipo sea idóneo para los propósitos previstos y su desempeño se debería monitorear durante el uso, cuando corresponda.

Cuando sea necesario, el equipo y los dispositivos de monitoreo deberían calibrarse y tener trazabilidad hasta normas nacionales, así como llevar a cabo las verificaciones intermedias necesarias y la recalibración, y documentar los procedimientos y los resultados.

Se recomienda verificar y mantener el equipo con regularidad con el fin de garantizar la seguridad y adaptación para el uso. Los equipos se deberían monitorear de acuerdo con las condiciones de trabajo y la precisión exigida para los resultados.

La frecuencia de calibración y de revisiones de verificación de cada elemento del equipo, en la mayoría de los casos, no se especifica en esta norma dado que debe ser determinada por cada laboratorio dependiendo del tipo de equipo y de su nivel de actividad, y debe estar en concordancia con las instrucciones del fabricante. En una cantidad limitada de casos, se ha especificado una frecuencia dado que se consideró esencial.

Los aparatos y equipos se deben construir e instalar para facilitar el funcionamiento y permitir la facilidad de mantenimiento, limpieza, descontaminación y calibración.

Las incertidumbres de la medición que se indican en esta sección se relacionan con el aparato y el equipo en cuestión y no con el método de análisis en su totalidad.

En toda esta sección, se proporcionan los requisitos para la precisión en la medición de los equipos de medición. Éstos se basan en la tolerancia práctica que se requiere para demostrar un control adecuado del equipo en el uso rutinario. La precisión establecida se relaciona con la incertidumbre metrológica del dispositivo (véase la norma ISO Guía 99).

Para el equipo de control de la temperatura, verifique la estabilidad y homogeneidad de la temperatura antes del uso inicial y después de toda reparación o modificación que pueda tener un efecto en el control de la temperatura.

## **5.2    CABINAS PROTECTORAS**

### **5.2.1    Descripción**

Una cabina protectora es una estación de trabajo con flujo de aire laminar horizontal o vertical para eliminar del aire el polvo y otras partículas tales como microorganismo.

La cantidad máxima tolerable de partículas por metro cúbico, con un tamaño superior o igual a 0,5  $\mu\text{m}$ , representa la clasificación de dispersión de polvo de un gabinete de seguridad. Para las cabinas utilizados en microbiología, la cantidad de partículas no debe exceder 4 000 por metro cúbico.

Las cabinas para uso en laboratorios microbiológicos son de cuatro tipos:

- a) Las cabinas de seguridad de clase I son cabinas protectores de escape con frente abierto destinados a la protección del operario y del ambiente, pero no protegerá al producto de la contaminación externa. Los aerosoles potencialmente infectados serán contenidos dentro de las cabinas y atrapados mediante impacto en el filtro. El aire filtrado normalmente se descarga hacia la atmósfera; si esto no se hace, el aire debe pasar a través de dos filtros HEPA montados en serie. Ellos no se recomiendan para trabajo con patógenos de categoría de riesgo 3 debido a las dificultades para mantener y garantizar una protección adecuada del operario.
- b) Las cabinas de seguridad de clase II protegen el producto, el operario y el ambiente. Ellos recirculan parte del aire filtrado, expulsando parte hacia la atmósfera y tomando aire de reemplazo a través de la abertura de trabajo, suministrando así la protección para el operario. Son adecuados para el trabajo con patógenos de la categoría de riesgo 3.
- c) Las cabinas con flujo de aire laminar horizontal protegen el trabajo contra la contaminación, pero expulsan los aerosoles generados hacia la cara del operario. Por lo tanto no son adecuados para manipular cultivos inoculados ni para la preparación de cultivos de tejidos.
- d) Las cabinas con flujo de aire laminar vertical protegen al producto mediante el uso del flujo laminar vertical del aire filtrado a través de los HEPA. También protegen al operario a través del uso de aire recirculado internamente. Son particularmente convenientes para brindar un ambiente aséptico para la manipulación de productos estériles y para proteger al operario cuando manipula productos en polvo.

Utilice cabinas protectoras para todo el trabajo que implique la manipulación de patógenos y polvos contaminados, si así lo exigen los reglamentos nacionales.

No se recomienda la utilización de quemadores de gas ni incineradores tipo alambre dentro de las cabinas. Si ello es necesario, el quemador de gas debería tener una llama pequeña de manera que no se perturbe el flujo del aire. Una alternativa conveniente es la utilización de equipo desechable (asas, pipetas, etc.)

### **5.2.2    Uso**

Las cabinas se deberían mantener libres de equipo, en la medida de lo posible.

Cuando sea factible, ponga todo lo necesario dentro de la cabina antes de empezar el trabajo con el fin de minimizar la cantidad de movimientos del brazo hacia dentro y fuera de la abertura

de trabajo. Coloque el equipo y los materiales de manera tal que se reduzca al mínimo la perturbación del flujo del aire en la abertura de trabajo.

Los operarios deberían estar adecuadamente entrenados en el uso correcto de las cabinas con el fin de garantizar su seguridad y la integridad del producto o el cultivo.

### **5.2.3 Limpieza y desinfección**

Limpie y desinfecte el área de trabajo después de la utilización con un desinfectante adecuado y no corrosivo, según las instrucciones del fabricante. Examine con regularidad las rejillas de alambre que protegen los prefiltros y limpie con un paño empapado de desinfectante.

Para las cabinas con flujo laminar, la superficie del filtro se debería limpiar al vacío con regularidad, teniendo cuidado para no dañar el medio de filtro.

Los gabinetes de seguridad se deberían fumigar antes del cambio o el mantenimiento del filtro.

Después de la limpieza de los gabinetes, se pueden utilizar lámparas UV para la desinfección. Estas lámparas se deberían limpiar con regularidad y reemplazar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **5.2.4 Mantenimiento e inspección**

Utilice gabinetes protectores que sean adecuados para la aplicación y las condiciones ambientales previstas del laboratorio.

La eficiencia de un gabinete protector debe ser verificada por una persona calificada en el momento del recibo y en adelante a intervalos regulares, según las recomendaciones del fabricante, y también después de toda reparación o modificación.

Se recomienda realizar la verificación periódica para determinar la ausencia de contaminación microbiana mediante la revisión de la superficie de trabajo y las paredes del gabinete.

Se aconseja realizar una verificación periódica de la cantidad de microorganismos transportados por el aire que están presentes durante la operación de los filtros utilizando el equipo usual. Por ejemplo, esponga varias cajas de Petri abiertas que contengan un medio de cultivo de agar no selectivo (por ejemplo PCA) en cada cabina durante 30 min. Se pueden utilizar otros métodos.

## **5.3 BALANZAS Y DILUTORES GRAVIMÉTRICOS**

### **5.3.1 Uso e incertidumbre de la medición**

Las balanzas se utilizan principalmente para pesar la porción de ensayo de la muestra que se va a examinar y los componentes del medio de cultivo y los reactivos. Además, se pueden utilizar para realizar mediciones de volúmenes del fluido de la dilución por masa

Los dilutores gravimétricos son instrumentos electrónicos que constan de una balanza y un dispensador de líquido programable que se utilizan durante la preparación de las suspensiones iniciales de la muestra; funcionan mediante la adición de diluyente a una submuestra en una relación establecida. La submuestra se pesa después según la tolerancia especificada en la aplicación y el dilutor se ajusta para dispensar una cantidad suficiente de diluyente para la relación exigida (por ejemplo, 9 a 1 para diluciones decimales).

Un laboratorio microbiológico para alimentos debe estar equipado con balanzas con rango e incertidumbre de medición exigidos para los diferentes productos que se van a pesar.

A menos que se indique algo diferente, los errores máximos permisibles deberían ser de 1 % o mejor al pesar las muestras de ensayo.

Ponga el equipo sobre una superficie horizontal y estable, ajustado según necesidad para garantizar que está a nivel y protegido contra la vibración y las corrientes de aire.

### **5.3.2 Limpieza y desinfección**

El equipo se debería limpiar y desinfectar después de la utilización o inmediatamente después del derrame durante el pesaje, con un desinfecte adecuado y no corrosivo.

### **5.3.3 Verificación de desempeño y calibración**

Una persona entrenada debe verificar regularmente el desempeño del sistema de balanzas durante el uso y después de la limpieza con pesas de verificación. La calibración debe ser revisada para todo el rango por una persona calificada, a una frecuencia que depende del uso.

Las pesas de verificación también se pueden revisar inmediatamente después de la calibración de la balanza.

## **5.4 HOMOGENIZADORES, MEZCLADORAS Y LICUADORAS**

### **5.4.1 Descripción**

Este equipo se utiliza para preparar la suspensión inicial a partir de la muestra de ensayo de productos no líquidos.

Se pueden utilizar los siguientes aparatos:

- mezclador peristáltico (*homogenizador peristáltico*) con bolsas estériles, posiblemente con un dispositivo para ajustar la velocidad y el tiempo,
- un homogenizador rotatorio (licuadora), cuya velocidad teórica esté entre 8 000 r/min y 45 000 r/min inclusive, con recipientes de vidrio o metálicos que se puedan esterilizar y equipados con tapas,
- un mezclador vibratorio (*sistema de pulsificación*) con bolsas estériles, o
- algún otro sistema de homogenización con eficiencia equivalente.

En algunos casos, la mezcla manual se puede realizar utilizando esferas de cristal estériles con un diámetro adecuado (aproximadamente 6 mm; véanse las normas NTC 4491-2 hasta la NTC 4491-4 y la ISO 6887-5).

### **5.4.2 Uso**

El tiempo usual de funcionamiento de un homogenizador peristáltico es de 1 min a 3 min. (véanse las normas NTC 4491-2 hasta la NTC 4491-4 y ISO 6887-5 con respecto a los alimentos específicos).

No use este tipo de aparatos para algunos productos alimenticios tales como:

- productos con riesgo de perforación de la bolsa (presencia de partículas filosas, duras o secas);
- productos que son difíciles de homogenizar debido a su textura (por ejemplo, las salchichas tipo salami).

El homogenizador rotatorio debe operar durante un tiempo que permita que la cantidad total de revoluciones esté entre 15 000 r/min y 20 000 r/min. Incluso en el homogeneizador más lento, este tiempo no debe exceder 2,5 min.

El mezclador vibratorio se puede usar para la mayoría de productos alimenticios, incluyendo los productos duros y secos. El tiempo usual de funcionamiento es de 0,5 min a 1 min. Si es probable que se encuentren microorganismos en la profundidad de estructuras cohesivas, la muestra se debería cortar en trozos pequeños antes del procesamiento.

Las esferas del cristal se pueden utilizar para la preparación, mediante agitación, de las suspensiones iniciales de algunos productos viscosos o espesos, en particular algunos productos lácteos (véase las normas específicas).

#### **5.4.3 Limpieza y desinfección**

Limpie y desinfecte los homogenizadores peristálticos y los mezcladores vibratorios con regularidad y después del vertido o derrame de las bolsas.

Para homogenizadores rotatorios, limpie y esterilice el recipiente metálico o de vidrio después de cada uso.

#### **5.4.4 Mantenimiento**

Inspeccione y mantenga el equipo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **5.5 MEDIDORES DE pH**

#### **5.5.1 Descripción**

El medidor de pH se utiliza para medir la diferencia potencial, a una temperatura determinada, entre un electrodo de medición y uno de referencia, ambos electrodos están introducidos en el producto. El medidor debe tener la capacidad para medir con una precisión de  $\pm 0,05$  unidades de pH y su resolución debe ser de 0,01 unidades de pH. El medidor de pH debe estar equipado con compensación de temperatura ya sea manual o automática.

NOTA El electrodo de medición y el de referencia usualmente están juntos en un sistema de electrodo combinado.

#### **5.5.2 Uso**

El medidor de pH se usa para medir el valor de pH del medio de cultivo y de los reactivos para verificar si se necesitan ajustes durante la preparación y como verificación de la calidad después de la esterilización.

También se pueden utilizar para medir el valor de pH de las muestras y de las suspensiones de la muestra. El uso de un medidor de pH se discute en la norma específica para el producto que se va a analizar, en la cual se especifican las condiciones para la determinación del valor de pH y para el ajuste de dicho valor.

Ajuste el medidor de pH según indicaciones del manual del fabricante y mida el valor de pH a una temperatura normalizada, por ejemplo 25 °C. Tome el valor de pH después de alcanzar la estabilización. Registre el valor con dos cifras decimales.

NOTA La lectura se puede considerar estable cuando el valor de pH medido en un período de 5 s varía no más de 0,02 unidades de pH. Utilizando electrodos en buena condición, normalmente el equilibrio se alcanza en un lapso de 30 s.

### **5.5.3 Verificación y ajuste**

Verifique el medidor de pH de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando por lo menos dos y, preferiblemente, tres soluciones amortiguadas estándar, por lo menos diariamente antes de la utilización. Defina los errores máximos permisible para esta verificación, dependiendo del uso.

Las soluciones estándar deben tener valores de pH específicos con dos cifras decimales a la temperatura de medición (en general, pH 7,00 y pH 4,00 o pH 9,00 a 25 °C, o ambos, según las instrucciones del fabricante). Estos estándares utilizados deben cubrir el valor de pH que se va a medir.

Después de la verificación del medidor de pH con las dos soluciones amortiguadas estándar trazables, el pH se debería verificar utilizando un tercer amortiguador, llamado amortiguador de control, por ejemplo de pH 5 u 8.

Ajuste el medidor de pH cuando las verificaciones den un resultado que esté por fuera de los errores máximos permisibles y según las instrucciones del fabricante.

Este ajuste puede ir seguido de una calibración la cual permitiría estimar la incertidumbre de medición del medidor de pH.

### **5.5.4 Mantenimiento**

Revise y mantenga los electrodos según las instrucciones del fabricante. Es necesario, en particular, monitorear con regularidad las siguientes condiciones:

- la condición de los electrodos con respecto al envejecimiento y la acumulación de suciedad, y
- el tiempo de respuesta y la estabilidad.

Enjuague los electrodos con agua destilada o desionizada después de cada uso. Con el fin de considerar la acumulación de suciedad y el envejecimiento de los electrodos, límpielos regularmente de forma más exhaustiva de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Almacene los electrodos según las instrucciones del fabricante.

## **5.6 AUTOCLAVES**

### **5.6.1 Descripción**

Una autoclave permite alcanzar una temperatura de vapor saturado en la cámara y se utiliza para la destrucción de microorganismos.

La autoclave debería estar equipada con:

- por lo menos una válvula de seguridad,
- un grifo de drenaje,
- un dispositivo de regulación que permita que la temperatura dentro de la cámara se mantenga en un rango de  $\pm 3$  °C con respecto a la temperatura objeto (para tener en cuenta la incertidumbre de medición asociada con el termopar de medición), y
- una sonda de temperatura o un termopar de registro.

También debería tener un cronómetro y un registrador de temperatura.

### **5.6.2 Uso**

Con la esterilización a vapor, todo el aire se expulsa antes de que se incremente la presión. Si la autoclave no está ajustada con un dispositivo automático de evacuación, es necesario eliminar el aire hasta que se emita un chorro continuo de vapor.

Para la destrucción de los microorganismos, el vapor saturado en la cámara debe estar a una temperatura mínima de 121 °C.

Durante el mismo ciclo de esterilización, no utilice la autoclave para esterilizar equipo limpio (o medios de cultivo) ni al mismo tiempo para descontaminar equipo utilizado (o medios de cultivo usados).

Es preferible utilizar autoclaves independientes para estos dos procesos. Después de estar en la autoclave, todos los materiales y el equipo se deberían dejar enfriar dentro de ésta antes de retirarlos.

Por razones de seguridad, no retire el contenido hasta que la temperatura haya caído por debajo de 80 °C aproximadamente.

### **5.6.3 Mantenimiento**

Limpie la cámara, drene el filtro y los sellos de la puerta con regularidad. Verifique la integridad de los sellos de la puerta. Realice las operaciones de drenaje y el descamado, si es necesario, a intervalos regulares según las recomendaciones del fabricante.

### **5.6.4 Verificación y calibración**

El autoclave se debe conservar en buenas condiciones de funcionamiento y personal competente y calificado la deben inspeccionar con regularidad de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Conserve los instrumentos de monitoreo en buen funcionamiento y verifíquelos con regularidad.

La validación inicial debería incluir estudios de desempeño para cada ciclo de operación y cada configuración de carga utilizados en la práctica. Es recomendable repetir este proceso después de reparaciones o modificaciones importantes. Dentro de la carga se deberían ubicar suficientes sensores de temperatura para demostrar la penetración adecuada del calor en todos los lugares. En la validación y la revalidación se debería considerar la idoneidad de los tiempos de incremento de calor y de descenso de la temperatura así como la temperatura de esterilización.

Para cada carga, como mínimo, se debería incluir un indicador del proceso en el centro de la carga con el fin de verificar el proceso de calentamiento cuando no se dispone de un registro trazable de la eficiencia del proceso.

## **5.7    PREPARADORES DE MEDIOS**

### **5.7.1    Descripción**

Un preparador de medios está diseñado principalmente para la esterilización de volúmenes grandes de medios (> 1 L). Consiste en un dispositivo con un recipiente de calentamiento, con chaqueta de agua y agitación constante. El equipo también debe tener calibre de temperatura, calibre de presión, cronómetro y válvula de seguridad.

Además, la unidad debería tener un bloqueo de seguridad para evitar la abertura hasta que se haya alcanzado una temperatura de < 80 °C.

### **5.7.2    Uso**

En todo momento se deben seguir las instrucciones del fabricante.

La totalidad del proceso de producción tiene lugar dentro del aparato. Después de la adición de todos los ingredientes, éstos se disuelven mediante agitación y calentamiento. A continuación se produce la esterilización.

### **5.7.3    Mantenimiento**

Lave el preparador y enjuague totalmente con agua purificada entre cada lote del medio.

### **5.7.4    Verificación**

El preparador se debe conservar en buenas condiciones de funcionamiento y personal competente y calificado lo debe inspeccionar con regularidad de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Conserve los instrumentos de monitoreo en buen funcionamiento y verifique su desempeño con regularidad.

La validación inicial debería incluir estudios de desempeño para cada ciclo de funcionamiento y cada tamaño de carga utilizados en la práctica. Este proceso se debería repetir después de reparaciones o modificaciones importantes. Se pueden utilizar dos sondas de temperatura, una adyacente a la sonda de control y otra alejada con el fin de demostrar el calentamiento uniforme.

Se recomienda verificar la temperatura y la duración de cada ciclo.

## **5.8    INCUBADORAS**

### **5.8.1    Descripción**

Una incubadora consta de una cámara aislada que permite que la temperatura se mantenga estable y uniformemente distribuida dentro del rango de error de temperatura máximo permisible especificado en el método de ensayo.

### **5.8.2    Uso**

Las incubadoras deben estar equipadas con un sistema de regulación que permita que la temperatura u otros parámetros se mantengan uniformes y estables en todo el volumen de trabajo. Defina el volumen de trabajo para garantizar que esto se logre.

Si la temperatura ambiente es próxima o superior a la de la incubadora, es necesario ajustar un sistema de enfriamiento en la cámara.

Las paredes de las incubadoras deberían estar protegidas de la luz solar.

Si es posible, las incubadoras no se deberían llenar totalmente en una sola operación porque el medio de cultivo tardará más en alcanzar la temperatura de equilibrio, cualquiera sea el tipo de incubadora que se utilice (convección de aire forzado u otro). Absténgase de dejar abierta la puerta de la incubadora por periodos largos.

Al cargar las incubadoras, se recomienda poner especial atención a la circulación del aire (véase el numeral 10.2.4).

### **5.8.3    Limpieza y desinfección**

Limpie y desinfectan con regularidad las paredes internas y externas de la incubadora y, si se requiere, retire el polvo del sistema de ventilación.

### **5.8.4    Verificación**

Revise la estabilidad de la temperatura y la homogeneidad de su distribución a la temperatura(s) de trabajo en la totalidad del volumen de trabajo de la incubadora mediante la utilización simultánea de un número de termómetros o termopares con precisión conocida y con un rango de temperatura adecuado.

Utilice la información para definir el rango aceptable de funcionamiento de la incubadora y la posición óptima del termómetro utilizado para monitorear las temperaturas de trabajo.

Por ejemplo, para lograr una temperatura objeto de de  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  cuando los datos del perfil muestran un rango de  $36,8\text{ °C}$  a  $37,3\text{ °C}$  en toda la incubadora, entonces el rango funcional se debería reducir a  $36,2\text{ °C}$  hasta  $37,7\text{ °C}$  con el fin de garantizar que todas las partes de la incubadora alcanzan la temperatura objeto de  $37\text{ °C}$ .

Este proceso se debería repetir después de toda reparación o modificación importante.

La temperatura de funcionamiento se debería verificar, por ejemplo, con uno o más termómetros máximos y mínimos o termopares de registro.

El termómetro o el termopar de registro utilizado para el monitoreo rutinario de la incubadora se debe fijar en una posición definida a partir de los datos del perfil para alcanzar la temperatura objeto.

Revise la temperatura de la incubadora por lo menos cada día laboral. Para este fin, cada incubadora debe incorporar por lo menos un dispositivo de medición funcional, cuyo bulbo se pueda sumergir en glicerol (u otro disipador de calor adecuado) contenido en un frasco sellado.

Se pueden utilizar otros sistemas de verificación con desempeño equivalente.

## **5.9    REFRIGERADORES, CUARTOS PARA ALMACENAMIENTO EN FRÍO**

### **5.9.1    Descripción**

Estos son cámaras que permiten mantener el almacenamiento en frío. Para la conservación de muestras de alimentos para el análisis, la temperatura debe ser de  $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  (errores máximos permisibles), excepto para aplicaciones particulares. Para otros usos, a menos que se especifique algo diferente, la temperatura debe ser de  $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ .

### **5.9.2    Uso**

Con el fin de evitar la contaminación cruzada, utilice cámaras diferentes o por lo menos recipientes diferentes, para lograr el aislamiento físico para el almacenamiento de:

- medios de cultivo no inoculados y reactivos,
- muestras de ensayo, y
- cultivo de microorganismos y medios incubados.

Cargue los refrigeradores, enfriadores o cuartos de almacenamiento en frío de forma tal que se conserve una circulación de aire correcta y se reduzca al mínimo el potencial de contaminación cruzada.

### **5.9.3    Verificación**

Revise la temperatura de cada cámara cada día laboral usando un termómetro o una sonda instalada permanentemente. La precisión requerida para el dispositivo de monitoreo de la temperatura depende del propósito para el cual se utilice la unidad.

### **5.9.4    Mantenimiento y limpieza**

Realice las siguientes operaciones de mantenimiento a intervalos regulares para garantizar el funcionamiento adecuado:

- eliminación del polvo de las aspas del motor o de las placas externas de intercambio térmico;
- descongelación;
- limpieza y desinfección del interior de las cámaras.

## **5.10    CONGELADORES Y CONGELADORES DE TEMPERATURA ULTRA BAJA**

### **5.10.1    Descripción**

Un congelador es una cámara que permite garantizar el almacenamiento en congelación. A menos que se especifique algo diferente, la temperatura debe ser inferior a  $-15\text{ °C}$ , preferiblemente por debajo de  $-18\text{ °C}$  para muestras de alimentos.

Un congelador de temperatura ultra baja es una cámara que permite garantizar el almacenamiento en congelación a temperatura ultra baja. A menos que se especifique algo diferente, la temperatura debe ser inferior a  $-70\text{ °C}$ .

## **5.10.2 Uso**

### **5.10.2.1 Congelador**

Se debe disponer de cámaras diferentes o, por lo menos, de recipientes diferentes para lograr el aislamiento físico para almacenamiento de:

- reactivos no inoculados,
- muestras para análisis, y
- cultivos de microorganismos.

Cargue el congelador de forma tal que se mantenga la temperatura suficientemente baja, en particular cuando se introducen productos no congelados.

### **5.10.2.2 Congelador de temperatura ultra baja**

El uso principal es para almacenamiento de microorganismos, cultivos de referencia y/o de trabajo y reactivos.

Cargue el refrigerador de forma tal que se conserve una temperatura suficientemente baja y se evite la contaminación cruzada entre microorganismos y reactivos.

## **5.10.3 Verificación**

Revise la temperatura de cada cámara con regularidad utilizando un dispositivo adecuado para el monitoreo de la temperatura.

## **5.10.4 Mantenimiento**

Realice regularmente las siguientes operaciones de mantenimiento:

- eliminación del polvo de las aspas del motor y de las placas externas de intercambio térmico (si son accesibles);
- descongelación;
- limpieza y desinfección del interior de las cámaras.

## **5.11 BAÑOS CONTROLADOS TERMOSTÁTICAMENTE**

### **5.11.1 Descripción**

Se requiere de un baño controlado termostáticamente, lleno con un líquido (agua, glicol etileno, etc.), con o sin una etapa ajustada u otro dispositivo para limitar la evaporación, con el fin de mantener la temperatura especificada. El control de la temperatura es a menudo más preciso que una incubadora de aire, permitiendo alcanzar errores máximos permisibles de  $\pm 0,5$  °C o mejores. Las temperaturas de trabajo y los errores máximos permisibles que se requieren se estipulan en cada aplicación o método individual. Es necesario un sistema de refrigeración para mantener una temperatura cercana o inferior a la temperatura ambiente.

### **5.11.2 Uso**

Los usos principales son los siguientes:

- incubación a una temperatura constante de un medio de cultivo inoculado;
- mantenimiento de medios de agar fundido estériles durante la preparación de los medios;
- templado de medios de agar fundido estériles para uso en métodos específicos;
- preparación de las suspensiones o soluciones iniciales de la muestra a una temperatura controlada;
- tratamiento térmico de las suspensiones iniciales de la muestra a una temperatura controlada (por ejemplo, pasteurización).

Cuando se requiere del control preciso de la temperatura, el baño debe estar equipado con una bomba de circulación de agua y un sistema automático de regulación de la temperatura. La agitación del líquido no debe causar dispersión de las gotas.

Se prefieren los baños con tapa para uso preciso o a temperatura alta. Se recomienda utilizar tapas en declive que permiten drenar el condensado.

Para la incubación de medios inoculados, mantenga el nivel del líquido de manera tal que la parte superior del medio de ensayo esté por lo menos 2 cm por debajo del nivel del líquido en el baño durante toda la incubación.

Se recomienda colocar otros recipientes dentro de los baños de manera que el nivel de su contenido esté por debajo del nivel del líquido.

La profundidad de inmersión debe evitar la entrada de agua a través del cierre.

Se puede requerir de dispositivos para mantener la estabilidad de los recipientes, por ejemplo rejillas.

Todos los recipientes se deberían secar después de retirarlos del baño y antes del uso posterior.

### **5.11.3 Verificación**

Revise la estabilidad y homogeneidad de la temperatura en todo el baño antes del uso inicial y después de toda reparación o modificación que tenga un efecto en el control de la temperatura.

Monitoree cada baño con un termómetro, un termopar o un dispositivo de registro de la temperatura con incertidumbre de medición mínima adecuada (véase el numeral 5.28.2), que sea independiente del sistema automático de regulación de la temperatura.

También se puede utilizar una pantalla digital, siempre que se verifiquen su precisión y resolución.

Monitoree la temperatura del baño durante cada uso y por lo menos diariamente durante periodos de incubación extensa.

#### **5.11.4 Mantenimiento**

Se recomienda llenar los baños con el líquido según las instrucciones del fabricante. Para la incubación de los cultivos, de preferencia se debería utilizar agua destilada o desionizada.

Verifique regularmente el nivel del líquido para garantizar el funcionamiento correcto del baño y la inmersión satisfactoria de los elementos en el baño. El nivel del líquido siempre debe cubrir los elementos de calefacción.

Se recomienda vaciar, limpiar, desinfectar y volver a llenar regularmente los baños a una frecuencia que depende de la utilización, o después de que se produzca un derrame.

### **5.12 VAPORIZADORES, INCLUYENDO BAÑOS DE AGUA EN EBULLICIÓN**

#### **5.12.1 Descripción**

Los vaporizadores y los baños de agua en ebullición constan de un elemento de calefacción rodeado por agua en un recipiente con una tapa hermética. En un vaporizador, esto crea vapor a la presión atmosférica; en un baño de agua en ebullición este elemento calienta el agua hasta la temperatura de ebullición o cerca del punto de ebullición, con o sin producción de vapor.

#### **5.12.2 Uso**

Los principales usos son los siguientes:

- fusión de los medios de agar;
- preparación de medios inestables al calor;
- reducción de la contaminación de los elementos pequeños del equipo entre cada uso.

En el recipiente debe haber un nivel seguro y adecuado de agua para garantizar que los elementos de calefacción estén cubiertos en todo momento.

También se puede utilizar una autoclave con un medio de vapor libre.

#### **5.12.3 Mantenimiento**

Mantenga limpios los vaporizadores y los baños de agua en ebullición.

Si es necesario, el descamado regular se debería realizar con una frecuencia que depende de la dureza del agua local.

### **5.13 HORNOS DE ESTERILIZACIÓN**

#### **5.13.1 Descripción**

Un horno de esterilización es una cámara que tiene la capacidad de mantener una temperatura de 160 °C hasta 180 °C para la destrucción de los microorganismos mediante calor seco.

#### **5.13.2 Uso**

Solamente se debe esterilizar el equipo robusto como por ejemplo elementos de vidrio y de metal en el horno de esterilización; no lo utilice para elementos plásticos o de caucho.

Antes de la esterilización, limpie los elementos de vidrio o de metal que se van a esterilizar en el horno.

Si en el horno de esterilización se esteriliza el equipo de vidrio volumétrico, verifique regularmente la precisión de los volúmenes marcados.

La temperatura debe ser uniforme en toda la cámara. El horno debe estar equipado con un termostato y un termómetro o un dispositivo de registro de la temperatura con exactitud adecuada.

Debería tener un indicador de duración, un programador o un cronómetro.

Una vez se ha alcanzado la temperatura de funcionamiento, el procedimiento de esterilización debe durar por lo menos 1 h a 170 °C o una combinación equivalente del tiempo/temperatura.

Después de la esterilización, para evitar el agrietamiento, se debe permitir que los elementos de vidrio se enfríen en el horno antes de retirarlos.

### **5.13.3 Verificación**

Revise la estabilidad y homogeneidad de la temperatura en todo el horno antes del uso inicial y después de toda reparación o modificación que pueda tener un efecto en el control de la temperatura.

El horno debe tener un termómetro calibrado, un termopar o un dispositivo de registro de temperatura con precisión adecuada, que sea independiente del sistema automático de regulación de la temperatura. El dispositivo de monitoreo debe tener una resolución de 1 °C o mejor a la temperatura utilizada en el horno.

La temperatura del horno se debería monitorear y registrar durante cada uso.

### **5.13.4 Mantenimiento**

Limpie las superficies internas cuando así se requiera.

## **5.14 HORNOS DE MICROONDAS**

### **5.14.1 Descripción**

Un horno de microondas es un dispositivo que permite el calentamiento de los elementos mediante energía de microondas a presión atmosférica

### **5.14.2 Uso**

Use el equipo disponible actualmente únicamente para calentar líquidos o fundir medios de cultivo de agar.

**ADVERTENCIA** No caliente medios que contengan componentes sensibles al calor en un horno de microondas a menos que se haya verificado que esta forma de calentamiento no afecta el desempeño del medio. Aún no se ha llevado a cabo una evaluación de la eficiencia de las microondas para esterilizar medios de cultivo y los hornos de microondas no se deben utilizar para este propósito.

El horno debe tener capacidad para calentar líquidos y medios de cultivo de manera controlada a través de un ciclo de emisión de microondas. La distribución de las microondas debe ser homogénea para evitar zonas de sobrecalentamiento. Los hornos equipados con tornamesa o con agitador para las microondas proporcionan una mejor distribución del calor.

No utilice equipo metálico, incluyendo cierres de metal. Afloje las tapas o los tapones de los frascos antes del calentamiento.

El calentamiento durante períodos más largos con tasas de potencia inferiores puede dar una mejor distribución del calor.

**ADVERTENCIA**    Manipule los elementos calientes con cuidado. El contenido puede estar muy caliente y bullir hacia el exterior, o los frascos pueden explotar.

Cuando se funde un medio de agar, se recomiendan un ajuste en potencia baja (por ejemplo en ciclo de descongelación) y un disipador de calor de agua (por ejemplo de 50 ml a 100 ml de agua en un vaso que se pueda llevar al microondas) para ayudar al control del proceso de calentamiento.

Se recomienda un tiempo de reposo mínimo de cinco min. después del proceso de calentamiento antes de retirar el recipiente del horno de microondas.

### **5.14.3 Verificación**

Se deben establecer tiempos de calentamiento y ajustes de potencia adecuados en la puesta en marcha inicial para los diferentes volúmenes de líquidos y medios de cultivo que se manejan rutinariamente, con el fin de garantizar el desempeño óptimo y evitar el sobrecalentamiento de productos sensibles.

### **5.14.4 Mantenimiento**

Limpie el horno inmediatamente después de que se produzca cualquier derrame, así como a intervalos regulares dependiendo del uso.

Se deberían inspeccionar los sellos de las puertas de los hornos para determinar su integridad y se debería verificar el horno a intervalos regulares para determinar fugas de radiación.

## **5.15 LAVADORAS PARA CRISTAL**

### **5.15.1 Descripción**

Las lavadoras de cristal para laboratorio son máquinas controladas electrónicamente para el lavado de vidriería general del laboratorio, las cuales se pueden programar para diferentes ciclos de lavado y enjuague (por ejemplo agua destilada o desionizada o ácido).

Los dispositivos para el lavado de pipetas de vidrio son lavadoras especiales diseñadas para limpiar los orificios angostos de las pipetas.

### **5.15.2 Uso**

Están disponibles muchos tipos de lavadoras de cristal y éstas, en general, se deben instalar y utilizar siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **5.15.3 Verificación**

Revise la eficacia de la limpieza mediante inspección visual y, en aplicaciones críticas, realice ensayos para garantizar que la vidriería esté libre de sustancias inhibitorias.

Los residuos ácidos o alcalinos se pueden verificar utilizando una solución indicadora de pH, se debería obtener un pH en el rango entre 6,5 y 7,3.

#### **5.15.4 Mantenimiento**

Programe el mantenimiento regular según lo especifique el fabricante, con una frecuencia adecuada.

Se puede requerir de mantenimiento más frecuente para el equipo muy utilizado o en áreas con agua dura.

### **5.16 MICROSCOPIOS ÓPTICOS**

#### **5.16.1 Descripción**

Existen varios tipos diferentes de microscopio: monocular, binocular, con VDU, una cámara o equipo de fluorescencia, etc., y con una fuente de luz interna o externa. Para análisis microbiológicos, se utilizan objetivos con aumento desde 10 x (lentes secos) hasta aproximadamente 100 (inmersión en aceite con torre con carga de resorte) para obtener una amplificación total de 100 hasta 1 000. El microscopio de contraste de fase también es importante para el análisis de "preparaciones húmedas".

#### **5.16.2 Uso**

Ajuste la óptica del microscopio de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El eje óptico de la luz proveniente de la bombilla de luz de alta intensidad debe pasar a través del centro del condensador bajo la platina, la platina y los lentes objeto hasta el ocular de manera que no se presenten aberraciones esféricas ni cromáticas.

#### **5.16.3 Mantenimiento**

Siga las instrucciones del fabricante con respecto al almacenamiento, la limpieza y el mantenimiento. Evite la presencia de condensación cuando la humedad es alta ya que esto puede llevar al deterioro de la calidad de los lentes.

Cada día o después del uso, retire el aceite de los lentes de inmersión y las partes relacionadas utilizando papel para lentes. Utilice un solvente recomendado por el fabricante. Retire regularmente la grasa producida por las pestañas en los lentes del ocular.

El sistema óptico se puede dañar fácilmente, por lo tanto, es preferible el mantenimiento por parte del fabricante.

### **5.17 QUEMADORES DE GAS O INCINERADORES TIPO ALAMBRE**

#### **5.17.1 Descripción**

Los quemadores de gas (Bunsen) producen una llama descubierta angosta, bien sea desde el suministro central o desde un cilindro de gas. La variación en la cantidad de aire mezclado con el gas controla el grado de calor producido.

Los incineradores tipo alambre usan gas o electricidad para obtener un calor rojo sin llama para esterilizar lazos y alambres rectos usados para manipular cultivos.

#### **5.17.2 Uso**

El quemador de gas se usa principalmente para esterilizar lazos metálicos y alambres rectos haciendo que alcancen un calor rojo y para esterilizar con llama otros elementos pequeños y durables del equipo.

Los incineradores tipo alambre se usan para esterilizar lazos metálicos y alambres rectos y se prefieren cuando se manipulan bacterias patógenas ya que previenen salpicaduras y evitan el riesgo de contaminación cruzada.

Los quemadores de gas pueden producir mucho calor y turbulencia de aire en el laboratorio.

Se pueden lograr técnicas asépticas sin un quemador de gas utilizando materiales desechables.

En cabinas proactivos, se debería evitar la utilización de quemadores de gas dado que pueden interferir de manera inaceptable con el flujo de aire laminar. En este caso, se recomienda utilizar equipo estéril desechable.

### **5.17.3 Mantenimiento**

Limpie y desinfecte regularmente los quemadores y las tapas de los incineradores tipo alambre, en particular si algún cultivo microbiano se ha derramado sobre los dispositivos.

## **5.18 DISPENSADORES PARA MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS**

### **5.18.1 Descripción**

Un dispensador es un instrumento o dispositivo utilizado para distribuir los medios de cultivo y los reactivos en tubos, frascos o cajas de Petri. Tales dispositivos van desde cilindros sencillos de medición, pipetas o jeringas manuales pasando por jeringas automáticas y bombas peristálticas, hasta dispositivos programables controlados electrónicamente con entrega variable automatizada.

### **5.18.2 Uso**

El equipo limpio utilizado para dispensar medios de cultivo y reactivos debe estar libre de sustancias inhibitorias. Utilice tubería independiente para medios selectivos con el fin de minimizar la percolación/transporte de dichas sustancias.

Si se requiere de la distribución aséptica de los medios de cultivo estériles y de los reactivos, todas las partes del equipo dispensador en contacto con el producto deben estar estériles.

### **5.18.3 Verificación**

La incertidumbre de la medición del instrumento o el aparato debe ser la correcta para el error máximo permisible en el volumen que se va a dispensar, el cual, rutinariamente, no debe exceder  $\pm 5\%$ . El error máximo permisible en la medición de volúmenes de fluidos de dilución utilizados para preparar diluciones decimales es  $\pm 2\%$ .

Revise los volúmenes dispensados antes del uso inicial, después regularmente según un programa documentado y siempre después de los ajustes que afecten el volumen dispensado.

### **5.18.4 Limpieza y mantenimiento**

Limpie la superficie exterior del dispensador después de cada uso. Lave y enjuague exhaustivamente todas las partes del dispensador que estén en contacto con el producto y esterilícelas, si se requiere, para uso en la dispensación de líquidos estériles. No utilice desinfectantes en las superficies que están en contacto con el producto que se va a dispensar ya que ellas pueden impartir propiedades inhibitorias.

Todos los dispensadores automáticos se deben conservar en buena condición mediante el mantenimiento regular, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## **5.19    MEZCLADORES DE VÓRTICE**

### **5.19.1 Descripción**

Este instrumento facilita la mezcla homogénea de medios líquidos (por ejemplo diluciones decimales y muestras de líquidos para ensayo) o suspensiones de células bacterianas en un líquido.

La mezcla se logra mediante un movimiento rotatorio excéntrico del contenido del tubo o del recipiente (produciendo un vórtice).

### **5.19.2 Uso**

Presione la base del tubo o del recipiente que contiene el líquido que se va a mezclar contra el cabezal del mezclador. La velocidad de mezcla se controla al variar la velocidad del motor o el ángulo de contacto con el cabezal del mezclador.

El operario debería garantizar que no se produzca derrame durante la mezcla mediante el ajuste de la velocidad, cuando sea necesario, y sosteniendo el tubo aproximadamente a un tercio de su longitud por debajo de la parte superior con el fin de poder controlarlo mejor y así evitar que el líquido se eleve demasiado en el tubo.

Se recomienda tomar las precauciones adecuadas para reducir al mínimo la liberación de aerosoles al abrir los recipientes que han estado en el vórtice.

### **5.19.3 Verificación**

La mezcla adecuada se evidencia con la aparición de un vórtice en toda la profundidad del líquido durante la operación de mezcla.

### **5.19.4 Mantenimiento**

Mantenga el equipo limpio. Si se producen derrames, descontamine el equipo utilizando un desinfectante de laboratorio adecuado.

## **5.20    DISPOSITIVOS PARA RECUENTO DE COLONIAS**

### **5.20.1 Descripción**

Los dispositivos manuales para recuento de colonias utilizan un dispositivo de recuento que se activa con la presión y usualmente produce una indicación audible de cada recuento y una lectura digital del recuento total. Pueden ser dispositivos tan simples como aquellos en forma de lapicero o pueden constar de una platina iluminada con una rejilla calibrada para la placa y una pantalla de amplificación para facilitar la detección de las colonias. Los contadores de colonias electrónicos automáticos que incorporan analizadores de imagen, funcionan mediante una combinación de sistemas de hardware y software que incorporan el uso de una cámara y un monitor.

### **5.20.2 Uso**

Siga las instrucciones del fabricante. Ajuste la sensibilidad de un contador automático para garantizar que se cuentan todas las colonias objeto. Los contadores de colonias electrónicos

automáticos también requieren de programación independiente cuando se utilizan con diferentes tipos de agar y de matrices, y para recuentos superficiales y de placas vertidas con el fin de garantizar la discriminación adecuada de las colonias objeto.

### **5.20.3 Verificación**

Las revisiones se deberían hacer manualmente y con regularidad para garantizar que se obtienen recuentos precisos utilizando un contador de colonias.

Además, los contadores de colonias automáticos se deberían verificar cada día de uso con una placa de calibración que contenga una cantidad conocida de partículas o colonias contables.

### **5.20.4 Mantenimiento**

Mantenga el equipo limpio y libre de polvo; evite rayar las superficies que son elemento esencial del proceso de conteo. Programe el mantenimiento regular de los contadores electrónicos que incorporan analizadores de imagen según lo especifique el fabricante, con una frecuencia conveniente.

## **5.21 EQUIPOS PARA CULTIVO EN UNA ATMÓSFERA MODIFICADA**

### **5.21.1 Descripción**

Éstos pueden ser un frasco que se pueda sellar herméticamente o cualquier otro equipo adecuado que permita mantener las condiciones de la atmósfera modificada (por ejemplo para anaerobiosis) durante el tiempo total de incubación del medio de cultivo. Se pueden utilizar otros sistemas con desempeño equivalente, tales como los gabinetes anaeróbicos.

Siga las instrucciones del fabricante para la instalación y el mantenimiento.

### **5.21.2 Uso**

La composición de la atmósfera que se requiere se puede lograr por medio de la adición de una mezcla de gas (proveniente, por ejemplo, de un cilindro de gas) después de la evacuación de aire del recipiente, mediante el desplazamiento de la atmósfera en un gabinete o mediante cualquier otro medio adecuado (como los paquetes de gas disponibles en el comercio).

En general, la incubación anaeróbica exige una atmósfera de menos de 1 % de oxígeno y de 9 % a 13 % de dióxido de carbono; la incubación y microaeróbica (capnaeróbica) exige una atmósfera de 5 % a 7 % de oxígeno y aproximadamente 10 % del dióxido de carbono.

Puede ser necesario modificar las condiciones dependiendo de los requisitos para los microorganismos específicos.

### **5.21.3 Verificación**

Ponga un indicador químico o biológico para monitorear la naturaleza de la atmósfera en cada cámara durante cada uso. El crecimiento de la cepa de control o un cambio en el color del indicador químico verifica que las condiciones de incubación adecuada se han alcanzado.

### **5.21.4 Mantenimiento**

Si se cuenta con un catalizador, regenérelo con regularidad de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Si existen válvulas, límpielas y lubríquelas para garantizar el funcionamiento correcto, y reemplácelas cuando sea necesario.

Limpie y esterilice regularmente el equipo.

## **5.22    CENTRÍFUGAS**

### **5.22.1 Descripción**

Las centrífugas son dispositivos operados mecánica o electrónicamente que utilizan la fuerza centrífuga para separar las partículas suspendidas, inclusive los microorganismos, de los fluidos.

### **5.22.2 Uso**

En algunas aplicaciones, la concentración de los microorganismos objeto se logra mediante la centrifugación de las muestras líquidas hasta obtener un depósito, las cuales se pueden volver a suspender en el líquido y someter a análisis adicional.

Tome las precauciones necesarias para evitar la generación de aerosoles y la contaminación cruzada, mediante el funcionamiento correcto del equipo y el uso de tubos o recipientes para centrifuga estériles y sellados.

### **5.22.3 Verificación**

Cuando la velocidad de centrifugado es crítica o específica para la aplicación, el indicador de velocidad, o los ajustes frente a un tacómetro calibrado independiente, se debería verificar regularmente y después de reparaciones o modificaciones significativas.

### **5.22.4 Mantenimiento**

Limpie y desinfecte regularmente las centrífugas y después de todo derrame que involucre cultivos microbianos o muestras potencialmente contaminadas.

Las centrífugas se deberían someter a mantenimiento con regularidad.

## **5.23    PLACA DE CALENTAMIENTO**

### **5.23.1 Descripción**

Las placas térmicas y las mantillas de calefacción son dispositivos de calefacción controlados termostáticamente. Algunos de estos dispositivos incorporan sistemas de agitación magnética.

### **5.23.2 Uso**

Las placas térmicas y las mantillas de calentamiento equipadas con sistemas de agitación magnética se utilizan para calentar volúmenes relativamente grandes de líquidos, como por ejemplo los medios.

No utilice placas térmicas ni mantillas de calefacción sin sistema de agitación para la preparación de los medios.

### **5.23.3 Mantenimiento**

Limpie todo derrame tan pronto la unidad esté fría.

## **5.24    DISPENSADORES EN ESPIRAL**

### **5.24.1 Descripción**

Un dispensador en espiral es un dispensador que distribuye un volumen predeterminado del líquido sobre la superficie de una placa de agar que está rotando. El brazo dispensador se mueve desde el centro de la placa hacia el borde exterior en una espiral Arquimediana. El volumen dispensado disminuye a medida que el dispositivo dispensador se mueve desde el centro hasta el borde de la placa, de modo que existe una relación inversa entre el volumen depositado y el radio de la espiral. El volumen de muestra dispensado en cualquier segmento particular es conocido y constante. Se requiere de una fuente de vacío para la carga y dispensación de los líquidos.

### **5.24.2 Uso**

El equipo se utiliza para dispensar una muestra líquida, una muestra homogeneizada o una dilución sobre una placa de agar con el fin de determinar un recuento de colonias. Después de la incubación, las colonias se desarrollan a lo largo de las líneas en donde se depositó el líquido. El número de colonias en un área conocida se cuenta utilizando una rejilla de recuento suministrada con el equipo, y se calcula el recuento.

La superficie de las placas de agar que se van a utilizar con el dispensador en espiral deben estar niveladas y libres de burbujas de aire.

Las placas se deberían secar previamente antes de su utilización para garantizar que están libres de exceso de humedad.

El sistema para dispensar se debería desinfectar y enjuagar con agua estéril antes de cada muestra y después del uso.

### **5.24.3 Verificación**

Revise el ángulo de la punta del estilete diariamente utilizando vacío para sostener un cubreobjetos contra la superficie del estilete. El cubreobjetos debería estar paralelo y a 1 mm desde la superficie del agar.

El patrón de dispensación se debería verificar a través de la dispensación de tinta lavable. El patrón del dispensador en espiral debería ser más denso cerca del centro de la placa en donde empieza la deposición y hacerse uniformemente menos denso hasta el punto de elevación del estilete. La porción transparente de la placa debería estar en el centro y tener aproximadamente 2,0 cm de diámetro.

Se recomienda realizar una verificación diaria para garantizar que la punta del estilete esté en el ángulo correcto con la superficie del agar utilizando el portaobjetos y el calibre de nivel suministrados con el instrumento.

Es conveniente verificar la esterilidad del dispensador en espiral vertiendo agua estéril en una placa para cada serie de muestras examinadas.

Se debería realizar una verificación gravimétrica regular del volumen dispensado utilizando agua destilada. La masa obtenida debería estar en el rango de error máximo permisible de  $\pm 5\%$  de la masa esperada para el volumen dispensado.

#### **5.24.4 Mantenimiento**

La desinfección de la tubería dispensadora y el estilete se puede lograr mediante el lavado con una solución que contenga de 0,5 % a 1 % de cloro libre. Este lavado se debería continuar con un lavado con agua estéril destilada o desionizada.

Las obstrucciones se pueden prevenir permitiendo que algunas partículas se sedimenten antes de cargar la suspensión de la muestra y utilizando una porción del líquido sobrenadante.

Se recomienda retirar todo los derrames inmediatamente y limpiar el equipo con regularidad.

El equipo se debería someter a mantenimiento y verificación dependiendo del uso.

### **5.25 DESTILADORES, DESIONIZADORES Y UNIDADES DE ÓSMOSIS INVERSA**

#### **5.25.1 Descripción**

Estos dispositivos se utilizan para producir agua destilada o desionizada/desmineralizada con la calidad exigida (véase la GTC 78) para la preparación de medios de cultivo microbiológicos o reactivos y para otras aplicaciones de laboratorio.

#### **5.25.2 Uso**

Instale, ponga en marcha y utilice el equipo de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con la debida consideración a la ubicación de los servicios de agua, electricidad y de desechos de laboratorio.

#### **5.25.3 Verificación**

El agua se debe verificar con regularidad o cuando se utiliza después del almacenamiento para determinar la conductividad satisfactoria, y no debe ser más de 25 uScm (equivalente a una resistividad  $\geq$  a 40 000 ohmios\*cm) para la preparación de medios y reactivos.

Si el agua es almacenada antes del uso o se produce a través de un intercambiador de iones, se recomienda realizar verificaciones idóneas para determinar la contaminación microbiana, según la GTC 78.

#### **5.25.4 Mantenimiento**

Los destiladores se deberían limpiar y descamar con una frecuencia que depende de la dureza del agua de entrada. Los desionizadores y las unidades de ósmosis inversa se deberían someter a mantenimiento según las instrucciones del fabricante.

### **5.26 CRONÓMETROS Y DISPOSITIVOS DE TIEMPO**

#### **5.26.1 Descripción**

Los cronómetros y los dispositivos integrados de tiempo son instrumentos que permiten usar periodos de tiempo correctos para muchas aplicaciones de laboratorio, cuando la duración se específica y es crítica.

#### **5.26.2 Uso**

Los cronómetros análogos y digitales manuales o de mesa utilizados para monitorear la duración de las operaciones de laboratorio (por ejemplo, la aplicación de tinturas a las películas

microbiana, la homogenización de muestras) deben estar en buenas condiciones de funcionamiento y tener la capacidad de lograr la precisión que se requiere.

Opere los cronómetros integrados al equipo de laboratorio (por ejemplo, autoclave, centrifugas, homogeneizadores) según las instrucciones del fabricante. Estos cronómetros deben tener la capacidad de lograr la precisión exigida.

### **5.26.3 Verificación**

Revise en comparación con la señal de tiempo nacional todos los cronómetros utilizados en las operaciones de laboratorio en que la duración es crítica para el resultado, con regularidad y después de reparaciones significativas.

### **5.26.4 Mantenimiento**

Limpie y verifique regularmente los cronómetros para determinar el funcionamiento correcto.

Los dispositivos de tiempo integrados se deberían verificar como parte del procedimiento de mantenimiento del instrumento.

## **5.27 PIPETAS Y PIPETEADORES**

### **5.27.1 Descripción**

Las pipetas son dispositivos de vidrio o de plástico desechable utilizadas para entregar volúmenes de materiales líquidos o viscosos; las pipetas graduadas entregan volúmenes medidos con una precisión que depende de la especificación.

Los pipeteadores automáticos (mecánicos) equipados con puntas plásticas son dispositivos que dispensan volúmenes fijos o ajustables de líquidos, mediante la acción de un pistón operado manual o eléctricamente.

### **5.27.2 Uso**

Deseche las pipetas que estén dañadas o rotas.

Las pipetas estériles graduadas o Pasteur y las puntas del pipeteador deberían tener un tapón de lana de algodón absorbente para evitar la contaminación cuando se utilizan para manipular cultivos microbianos.

No utilice la boca para pipetear en medios microbianos, excepto para líquidos no contaminados.

Los bulbos utilizados en las pipetas graduadas o Pasteur y las puntas para los pipeteadores deben ser de tamaño correcto para prevenir la fuga y garantizar el funcionamiento eficiente.

### **5.27.3 Verificación**

Revise las pipetas graduadas para confirmar la entrega de los volúmenes correctos, si el fabricante no certifica su exactitud (veracidad y precisión).

La calibración de las pipetas/pipeteadores se describe en las normas ISO 835 (todas sus partes) e ISO 8655-1.

Someta a ensayo los pipeteadores nuevos antes del uso y a intervalos regulares dependiendo de la frecuencia y la naturaleza del uso, para confirmar que respetan los errores máximos permisibles que se definen en ISO 8655-1. Realice verificaciones gravimétricas intermedias utilizando agua destilada o desionizada para garantizar que los volúmenes dispensados permanecen en los rangos de los errores máximos permisibles.

Verifique los lotes nuevos de pipetas graduadas.

#### **5.27.4 Mantenimiento**

Descontamine y limpie/esterilice las pipetas no desechables y los pipeteadores automáticos según corresponda después de cada uso.

Si los cilindros o los pistones de los pipeteadores automáticos se contaminan durante el uso, desármelos para su descontaminación y limpieza. Después vuélvalos a armar y repita la calibración. Cuando no es posible realizar esto en el laboratorio, devuelva los pipeteadores al fabricante para que los arme y calibre nuevamente.

### **5.28 TERMÓMETROS Y DISPOSITIVOS PARA MONITOREO DE TEMPERATURA, INCLUYENDO REGISTRADORES AUTOMÁTICOS**

#### **5.28.1 Descripción**

Los termómetros son dispositivos del tipo de mercurio en vidrio o de alcohol en vidrio que se utilizan para monitorear temperaturas en todo el rango de actividades del laboratorio.

Otros dispositivos de monitoreo de la temperatura incluyen los termómetros de resistencia de platino e instrumentos que utilizan termopares para medir temperatura y brindan un registro visual, impreso o electrónico de la variación de la temperatura en el tiempo.

Los termómetros y otros dispositivos de monitoreo de temperatura de referencia deben estar calibrados según normas nacionales e internacionales y tener certificados de tal calibración. Se deben utilizar con propósitos de referencia únicamente y no se deben utilizar para el monitoreo rutinario.

Los termómetros y otros dispositivos de registro de temperatura utilizados en el trabajo se deben calibrar de manera tal que permitan la trazabilidad hasta normas nacionales e internacionales.

También se pueden utilizar como termómetros de trabajo los dispositivos con exactitud adecuada que cumplan con una especificación internacional o nacional, después de verificar su desempeño.

#### **5.28.2 Uso**

Los termómetros y otros dispositivos de monitoreo de la temperatura deben tener la capacidad para medir la temperatura que se requiere para una aplicación dentro de los errores permisibles máximos especificados.

La incertidumbre de la medición del dispositivo de monitoreo de la temperatura debería ser cuatro veces menor que el rango de error máximo permisible. Por ejemplo, para un error máximo permisible objeto de  $\pm 1$  °C, la incertidumbre de la medición debería ser de  $\pm 0,25$  °C; para un error máximo permisible objeto de  $\pm 0,5$  °C, la incertidumbre de la medición debería ser

de  $\pm 0,125$  °C. La incertidumbre de la medición de la calibración del termómetro de referencia también se debería tomar en consideración al determinar la temperatura de funcionamiento.

Los termómetros o los termopares ubicados en incubadoras de aire deberían estar asegurados en recipiente adecuados llenos con glicerol, parafina líquida o propileno glicol para amortiguación contra la pérdida de calor cuando se abre la puerta y para obtener una lectura estable.

Utilice termómetros de inmersión total únicamente con el bulbo sumergido.

Los termómetros que se ponen en baños de agua se deberían sumergir en ésta de acuerdo con las especificaciones individuales, por ejemplo es recomendable que los termómetros de inmersión parcial se sumerjan hasta la profundidad especificada para dicho termómetro, por ejemplo 76 mm o 100 mm.

No utilice los termómetros si la columna de mercurio o de alcohol está rota.

Los termómetros de mercurio en vidrio son frágiles y, si existe el riesgo de ruptura, se deberían colocar dentro de cajas protectoras que no interfieran con las mediciones de la temperatura.

**ADVERTENCIA** El mercurio es peligroso para la salud. Elimine los derrames de acuerdo con los reglamentos nacionales.

### **5.28.3 Verificación**

Los termómetros de referencia se deben calibrar en la totalidad del rango frente a normas nacionales e internacionales que tengan trazabilidad antes del uso inicial y por lo menos cada cinco años. La calibración de los puntos únicos intermedios (por ejemplo el punto de congelación) se debe realizar para verificar el desempeño.

Los termopares de referencia se deben calibrar totalmente frente a normas nacionales e internacionales que tengan trazabilidad antes del uso inicial y según las instrucciones del fabricante. Las verificaciones intermedias se deben hacer frente a termómetros de referencia para verificar el desempeño.

Los otros dispositivos de monitoreo de la temperatura (tales como los receptores de onda de radio) se deben calibrar frente a normas nacionales e internacionales que tengan trazabilidad según las instrucciones del fabricante.

Los termómetros y los termopares de trabajo se deberían revisar en el punto de congelación o frente a un termómetro de referencia en el rango de temperatura de trabajo.

### **5.28.4 Mantenimiento**

Mantenga los termómetros y los termopares en una condición limpia y en buen estado.

Mantenga otros dispositivos de monitoreo de la temperatura de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## **5.29 SEPARADOR INMUNOMAGNÉTICO**

### **5.29.1 Descripción**

Este equipo se utiliza para separar y concentrar microorganismos objeto en cultivos líquidos por medio de esferas paramagnéticas recubiertas con un anticuerpo adecuado.

Los separadores manuales consisten en un mezclador rotatorio con capacidad de 12 r/min o 20 r/min y un concentrador de partículas con una barra magnética removible.

Los separadores automáticos utilizan arreglos similares a peines de barras magnéticas y gradillas para tubos. Las partículas magnéticas se mueven de un tubo a otro y permiten que se realice automáticamente el procedimiento de separación total en un ambiente cerrado, incluyendo las fases de lavado.

### **5.29.2 Uso y verificación**

Para el uso, siga las instrucciones del fabricante y aquellas indicadas en las normas específicas (por ejemplo para *E. coli* O157).

Para sistemas manuales, verifique la velocidad de rotación del mezclador.

Para sistemas manuales y automáticos, verifique que el sistema tenga la capacidad para aislar niveles bajos del microorganismo objeto antes de ponerlo en servicio para uso rutinario.

Es importante apreciar el potencial de contaminación cruzada durante los procedimientos de separación manual y tomar las medidas correspondientes para evitar que esto suceda.

### **5.29.3 Mantenimiento**

Realice la inspección y el mantenimiento del equipo según las instrucciones del fabricante.

## **5.30 SISTEMA DE FILTRACIÓN**

El sistema de filtración utilizado debe ser como el descrito en el proyecto de norma DE 060-08.

## **5.31 OTRO EQUIPO Y SOFTWARE**

Otros equipos y su software asociado deben tener la capacidad de lograr la exactitud requerida y cumplir con las especificaciones pertinentes para los ensayos en cuestión. Se deben establecer programas de calibración para cantidades o valores clave cuando tales propiedades tienen un efecto significativo en el resultado. Antes del uso rutinario, calibre o verifique el equipo para establecer que satisface los requisitos del laboratorio y cumple las especificaciones de la norma correspondiente. Todas las re-configuraciones o modificaciones hechas por el laboratorio al software se deben verificar para garantizar que el software modificado proporciona el resultado correcto.

## **6. PREPARACIÓN DE LA VIDRIERIA Y DE OTROS MATERIALES DE LABORATORIO**

### **6.1 PREPARACIÓN**

La vidriería y los otros materiales de laboratorio utilizados en microbiología deben tener un diseño adecuado, se deben utilizar correctamente y preparar de modo tal que se garantice su limpieza y/o esterilidad hasta el momento de su utilización.

Su diseño debería prevenir o limitar el contacto entre el operario y el material infeccioso.

Los tubos y los frascos se deberían tapar con medios adecuados. Si es necesario, es recomendable que la vidriería que se va a esterilizar (por ejemplo las pipetas) se ponga en recipientes especiales o envolver con un material adecuado (papel especial, lámina de

aluminio, etc.). La vidriería que se va a llevar a autoclave vacía debería permitir el acceso libre del vapor, de lo contrario no se lograra la esterilización.

## **6.2    ESTERILIZACIÓN/DESCONTAMINACIÓN**

### **6.2.1    Generalidades**

Se recomienda registrar la temperatura y duración de la esterilización/descontaminación. Se pueden utilizar indicadores de esterilización para distinguir entre los materiales esterilizados y los no esterilizados.

### **6.2.2    Esterilización por calor seco**

La vidriería y demás materiales se colocan en un horno de esterilización por lo menos durante una h a 170° C o equivalente.

### **6.2.3    Esterilización por el calor húmedo (vapor)**

El vapor húmedo bajo presión es el método más eficaz para esterilizar la vidriería y los materiales del laboratorio. La temperatura de la cámara de la autoclave debe conservarse a 121 °C por lo menos durante 15 min. (Véase el numeral 5.6).

### **6.2.4    Descontaminación con sustancias químicas**

Utilice sustancias químicas (por ejemplo productos a base de cloro, alcoholes, compuestos de amonio cuaternario) en concentraciones correctas y durante el tiempo de contacto correcto.

Asegúrese de que los residuos químicos no afectarán la recuperación de los microorganismos.

## **6.3    EQUIPO Y MATERIALES DESECHABLES**

Se pueden utilizar equipos y materiales desechables en lugar de equipo y materiales reutilizables (vidriería, cajas de Petri, pipetas, frascos, tubos, lazos, dispersores, etc.) sin sus especificaciones son similares.

Es aconsejable verificar que dicho equipo es adecuado para el uso en microbiología (en particular con respecto a su esterilidad) y que el material no contiene sustancias que inhiban el crecimiento de los microorganismos (véase la norma ISO 9998).

## **6.4    ALMACENAMIENTO DE LA VIDRIERÍA Y LOS MATERIALES LIMPIOS**

Durante el almacenamiento, proteja la vidriería y los materiales limpios contra el polvo, en condiciones que conserven su limpieza.

## **6.5    MANEJO DE VIDRIERÍA Y MATERIALES ESTÉRILES**

Almacene la vidriería y los materiales en condiciones que garanticen que permanecerán estériles. Almacene el equipo de un solo uso de acuerdo con las instrucciones del fabricante, sin deteriorar el empaque. Almacene el equipo preparado en el laboratorio en condiciones de limpieza.

Cuando el equipo de esterilización está destinado para microbiología, señale una fecha de expiración (o fecha de fabricación) en cada paquete.

## **6.6 USO DE LA DESCONTAMINACIÓN Y LA DESINFECCIÓN**

### **6.6.1 Descontaminación de equipo desechable**

Descontamine el equipo desechable antes de su disposición final.

Además de los métodos descritos en esta sección, se puede utilizar la incineración. Si existe un incinerador en las instalaciones, la descontaminación y la disposición final se pueden realizar en una sola operación.

### **6.6.2 Descontaminación de la vidriería y los materiales antes del uso**

En general, la esterilización del equipo se debería hacer mediante calor húmedo (véase el numeral 6.2.3) o calor seco (véase el numeral 6.2.2).

En algunas situaciones (por ejemplo el muestreo en campo) la descontaminación química puede ser la adecuada. Después de tal tratamiento, el equipo debería estar libre de sustancias inhibitorias.

### **6.6.3 Descontaminación de la vidriería de los materiales después del uso**

Para la descontaminación y la disposición final, los materiales se deberían colocar dentro de recipientes, por ejemplo en bolsas plásticas para autoclave. El método de llevar a autoclave es el de preferencia para todos los procesos de descontaminación (por lo menos 30 min. a 121 °C). La autoclave se debería cargar de forma tal que se favorezca la penetración del calor en la carga (por ejemplo evitando el exceso de paquetes) y teniendo cuidado de aflojar los tapones/las tapas y abrir las bolsas.

Se puede utilizar métodos alternativos diferentes de la autoclave si así lo permiten los reglamentos nacionales.

Lleve al autoclave todo el equipo que ha estado en contacto con los cultivos microbiológicos (medios de cultivo sólidos o líquidos), incluyendo los recipientes reutilizables antes de ser lavados.

Durante el análisis, se puede utilizar la descontaminación mediante inmersión en desinfectante con dilución reciente preparada para uso para el equipo de tamaño pequeño y resistente a la corrosión (por ejemplo las pipetas).

Utilice las pipetas Pasteur únicamente una vez.

La mayoría de los desinfectantes (véase el Anexo A) tienen algunos efectos tóxicos. Utilice guantes y protección ocular cuando manipule desinfectantes concentrados.

## **6.7 MANEJO DE RESIDUOS**

La correcta disposición final de los materiales contaminados no afecta directamente la calidad del análisis de la muestra pero es un tema de buen manejo del laboratorio.

Este manejo debería cumplir con los reglamentos nacionales ambientales o de salud y seguridad.

Se recomienda establecer un sistema para la identificación y separación de los materiales contaminados y sus recipientes para:

- residuos no contaminados (por ejemplo muestras de alimentos no cultivadas) que se pueden eliminar con los residuos generales,
- escalpelos, agujas, cuchillos, cristal roto,
- material contaminado para autoclave y reciclado, y
- material contaminado para autoclave y disposición final o para disposición final únicamente si el material se va a incinerar (sin embargo, véanse los requisitos especiales para los microorganismos en categoría de riesgo 3 que se presentan posteriormente).

La incineración de materiales contaminados y sus recipientes se debería realizar según los reglamentos nacionales ambientales o de salud y seguridad.

Los materiales contaminados con microorganismos en la categoría de riesgo 3 y sus recipientes se deben llevar a autoclave antes de su incineración.

## **6.8    LAVADO**

Lave el equipo reutilizable únicamente después de que se haya descontaminado. Después del lavado, enjuague todo el equipo con agua desionizada.

Se puede utilizar equipo especializado para facilitar las operaciones de limpieza (por ejemplo una lavadora de pipetas, una lavadora de platos, una cubeta ultrasónica).

Después del lavado, el equipo reutilizable debe estar libre de residuos que puedan afectar el crecimiento posterior de los microorganismos.

## **7.    PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

Prepare y esterilice los medios de cultivo de acuerdo con las normas GTC 78 e ISO/TS 11133-2.

## **8.    MUESTRAS DE LABORATORIO**

### **8.1    MUESTREO**

#### **8.1.1    Generalidades**

Aunque son extremadamente importantes para la interpretación de los resultados, el muestreo y los planes de muestreo no son parte de esta norma internacional. Es importante que el laboratorio reciba una muestra que sea representativa del lote de producto y que ésta no se haya deteriorado ni sufrido cambios durante el transporte y el almacenamiento.

Es recomendable que la muestra esté protegida contra contaminación externa debida al aire, al recipiente de la muestra, a los dispositivos de muestreo utilizados y a la manipulación inadecuada. Un recipiente para muestra no se debería llenar más allá de tres cuartos con el fin de evitar derrames y permitir la mezcla adecuada de la muestra en el laboratorio.

Identifique las muestras de manera clara y completa y registre su información.

Con frecuencia, la temperatura en el momento de la recolección y después de recibir la muestra es útil para el laboratorio en la interpretación de los resultados.

La muestra se debería presentar en su recipiente original cerrado.

Si el producto es voluminoso o está en un recipiente demasiado grande para presentarlo laboratorio, transfiera de manera aséptica una porción de la muestra a un recipiente estéril.

El recipiente estéril para la muestra se debería abrir sólo durante el tiempo suficiente para permitir la transferencia de la muestra y se debería cerrar inmediatamente.

### **8.1.2 Plan de muestreo**

El muestreo no es parte de esta norma. Consulte la norma internacional específica que trata del producto en cuestión, si está disponible.

## **8.2 TRANSPORTE**

La manera de transportar las muestras hasta el laboratorio debe garantizar que éstas se mantengan en condiciones que reduzcan al mínimo toda alteración en la cantidad de microorganismos presentes.

Entregue las muestras al laboratorio de manera oportuna conservando, en la medida de lo posible, las condiciones de almacenamiento originales.

La muestra debería estar empacada de manera tal que se evite su ruptura o derrame.

La etiqueta del producto debería indicar si se requiere refrigeración.

Las muestras que no requieren refrigeración o congelación se pueden empacar en un recipiente utilizando materiales de empaque adecuados para evitar la ruptura.

No utilice hielo suelto ya que puede causar contaminación del producto si el recipiente se rompe o si hay fugas.

A menos que se especifique algo diferente en las normas específicas (por ejemplo: NTC 4491-1 e DE 027-08) se recomiendan las siguientes temperaturas durante el transporte:

- productos estables: temperatura ambiente (por debajo de 40 °C);
- productos congelados o con congelación a temperatura ultra baja: por debajo de -15 °C, preferiblemente por debajo de -18 °C;
- otros productos no estables a temperatura ambiente: 1 °C a 8 °C;
- muestras por frotis (muestras de hisopos): véanse las normas ISO 18593 e ISO 17604.

Cuando no se especifican las condiciones, se recomienda que las partes involucradas lleguen a un acuerdo sobre la duración y la temperatura del transporte.

## **8.3 RECIBO**

Verifique la condición de las muestras en el momento de su recibo.

Si la condición de las muestras no es satisfactoria o si las muestras son insuficientes, el laboratorio debería rechazar dichas muestras.

En circunstancias especiales, se pueden someter a ensayo, después de discusión y acuerdo con el cliente.

Sin embargo, el informe ensayo debe incluir reservas acerca de la validez de los resultados.

Documente las muestras admitidas en el laboratorio de manera tal que se pueda monitorear su progreso durante todo el tiempo de elaboración del informe ensayo. La identidad y codificación de las muestras, así como los registros deben garantizar la trazabilidad en todas las fases en el laboratorio.

Si es necesario, se recomienda desinfectar las superficies externas de los recipientes utilizando un desinfectante adecuado.

Verifique los recipientes de la muestra para determinar efectos físicos evidentes:

Tome nota de la siguiente información:

- fecha (y hora, si es pertinente) de recibo;
- detalles del muestreo (fecha y hora del muestreo, si son pertinentes y se conocen, condición de la muestra);
- nombre y dirección del cliente.

Al recibir muestras perecederas, registre la temperatura de transporte o la temperatura de una muestra simulada que se incluye para este propósito.

Examinen las muestras tan pronto sea posible después de su recibo, de preferencia en un lapso de 24 h o según acuerdo entre las partes interesadas.

Para productos altamente perecederos (como los mariscos), se recomienda que el ensayo empiece dentro de las 24 h posteriores al muestreo. Para productos perecederos (como pescado, leche cruda, etc.) el ensayo debería empezar dentro de las 36 h.

Si no se pueden respetar los límites para el ensayo mencionados arriba, las muestras se pueden congelar a temperatura inferior a -15 °C, de preferencia a -18 °C, siempre que se haya demostrado que la recuperación de los microorganismos objeto no se deteriora significativamente con la matriz de muestra en cuestión.

#### **8.4    ALMACENAMIENTO**

Almacene las muestras que están esperando el análisis en condiciones que reduzcan al mínimo toda alteración en la cantidad de los microorganismos presentes.

Se recomiendan las siguientes temperaturas de almacenamiento:

- productos estables: temperatura ambiente (18 °C a 27 °C);
- productos congelados o con congelación a temperatura ultra baja: por debajo de -15 °C, preferiblemente por debajo de -18 °C;

- otros productos no estables a temperatura ambiente, incluyendo alimentos deteriorados:  $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  (véanse las normas NTC 4491-2 hasta la NTC 4491-4 o DE 027-08);
- muestras de hisopos: véanse las normas ISO 18593 e ISO 17604.

## **8.5      PORCIÓN DE ENSAYO**

### **8.5.1    Reglas específicas para la toma de porciones de ensayo**

Consulte la parte correspondiente de ISO 6887 o ISO 8261, con respecto a las reglas específicas para la toma de la porción de ensayo y la preparación del homogenado y la suspensión inicial.

### **8.5.2    Conservación y destrucción de las muestras de laboratorio**

Excepto en casos especiales, conserve las muestras de laboratorio hasta que se hayan obtenido todos los resultados o por más tiempo si es necesario, empáquelas en un recipiente estéril (por ejemplo en una bolsa plástica) y llévelas nuevamente a su temperatura de almacenamiento original.

Los productos perecederos se deberían congelar.

NOTA    No es una práctica normalmente aceptada el repetir el ensayo en las muestras debido a posibles cambios en el estado microbiano.

## **9.      ANÁLISIS**

### **9.1      PRECAUCIONES HIGIÉNICAS DURANTE EL ANÁLISIS**

Para evitar la contaminación del ambiente y de las porciones de ensayo, manipule los productos en polvo (deshidratados) en una habitación independiente o en un gabinete de seguridad.

Antes de abrir las muestras ordinarias, frote el área alrededor del punto destinado a la abertura con alcohol al 70 % (por volumen) u otro producto equivalente y permita que se evapore. Antes de abrir paquetes estériles, sumerja el área que se va a abrir en una solución que contenga 100 ppm a 200 ppm de cloro libre (u otro esterilizante adecuado) durante 10 min. por lo menos para destruir los microorganismos que puedan contaminar la muestra.

Todo instrumento que se utilice para abrir el empaque y retirar la totalidad o parte de la muestra (abrelatas, tijeras, cucharas, pinzas, pipetas, etc.) debe estar estéril.

El área de trabajo circundante se debería limpiar y frotar con un desinfectante adecuado antes de empezar el ensayo.

Es recomendable lavar las manos inmediatamente antes de empezar los ensayos y nuevamente durante el ensayo, si se llegan a contaminar.

Todos los instrumentos utilizados deberían estar estériles y protegidos contra la exposición a la contaminación antes y durante el uso.

Todos los instrumentos y herramientas utilizados se deberían colocar en un recipiente adecuado para su posterior disposición final o esterilización.

Tome precauciones de tal forma que el trabajo se realice, en la medida de lo posible, en condiciones asépticas. Por ejemplo:

- a) Asegúrese de que el área de trabajo esté limpia, que se hayan eliminado o se hayan reducido al mínimo todas las posibles fuentes de contaminación y que no haya corrientes de aire (es decir que las puertas y ventanas estén cerradas), y evite el movimiento innecesario del personal durante el análisis.
- b) Antes y después del trabajo, descontamine la superficie de trabajo con un desinfectante adecuado.
- c) Antes de empezar, asegúrese de disponer de todo lo necesario para realizar el trabajo (y únicamente eso).
- d) Realice el trabajo sin retrasos.
- e) Separe las actividades "limpias" y "sucias" en el tiempo o el espacio (esto es particularmente importante con muestras de alto riesgo tales como carne cruda y huevos crudos).
- f) Utilice equipo desechable.
- g) Si no se utiliza todo el contenido de un paquete de pipetas desechables, cajas de Petri, etc. durante el transcurso de un análisis, asegúrese de que el paquete esté adecuadamente cerrado después de retirar la cantidad correcta de unidades.
- h) Limpie inmediatamente todo derrame con almohadillas de algodón o cualquier otro material adecuado impregnado con alcohol al 70 % (por volumen) o cualquier otro desinfectante adecuado<sup>1)</sup>, luego limpie y desinfecte la superficie de trabajo antes de continuar.
- i) Utilice un gabinete de seguridad para la manipulación de productos que probablemente contengan bacterias patógenas, si así lo exigen los reglamentos nacionales.
- j) Al retirar una pipeta estéril de una caja, no permita que la punta toque las superficies exteriores de las pipetas que quedan en la caja ya que tales superficies están sometidas a contaminación.
- k) No permita que la pipeta toque los bordes o el cuello de los frascos de dilución.

Los aerosoles son una causa importante de contaminación ambiental y de infección. Los aerosoles se pueden formar por ejemplo:

- al abrir cajas de Petri, tubos y frascos;
- cuando se utilizan agitadores, jeringas, centrifugas, etc.;
- al desocupar las pipetas;
- cuando se esterilizan agujas o lazos de inoculación húmedos;
- cuando se abren ampollas que contienen cultivos secos congelados.

---

<sup>1)</sup> Cuando se utilizan desinfectantes diferentes al alcohol al 70 % (por volumen) es necesario cumplir los tiempos de contacto correctos según las instrucciones del fabricante para que la desinfección sea eficaz.

Por lo tanto, se debe reducir al mínimo su formación.

Para métodos moleculares, tome precauciones adicionales según la NTC 5158.

## **9.2    PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN INICIAL Y LAS DILUCIONES**

### **9.2.1    Generalidades**

Prepare la suspensión inicial y las diluciones de acuerdo con la parte correspondiente de ISO NTC 4491-1 o DE 027-08. El tiempo que transcurre entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el momento en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe exceder 45 min., a menos que se mencione un tiempo específico en la norma pertinente.

Las etapas de suspensión inicial y diluciones pueden ir seguidas de una etapa de enriquecimiento según se describe en las normas específicas.

### **9.2.2    Concentración**

#### **9.2.2.1 Centrifugación o filtración por membrana**

Si se requiere de la enumeración de cantidades bajas de microorganismos, ésta se puede mejorar en términos tanto de sensibilidad como de precisión mediante la introducción de una etapa de concentración de la porción de ensayo. Esta concentración se puede lograr mediante centrifugación o filtración por membrana.

Si se utiliza la centrifugación, vuelva a suspender el depósito centrifugado en un volumen conocido de diluyente y continúe el análisis.

Para cada combinación (alimento más microorganismo) considerada, previamente se debe realizar un estudio (véase por ejemplo la referencia [23]) con el fin de demostrar si la adición de una etapa de concentración es necesaria y válida. Se debe evaluar la facilidad de filtración de las suspensiones de alimentos.

Es recomendable verificar el desempeño del método completo en términos de sensibilidad, selectividad, linealidad y repetibilidad. Si el nivel de contaminación no se conoce, el método estándar (sin filtración) se debería ejecutar en paralelo.

#### **9.2.2.2 Inmunoseparación**

Si números bajos del microorganismo objeto están presentes en la muestra, la separación y concentración de los microorganismos se pueden lograr con esferas inmunomagnéticas recubiertas con anticuerpos específicos.

Disperse las esferas, junto con los microorganismos objeto capturados, directamente sobre el medio sólido específico de acuerdo con las normas específicas. Sin embargo, verifique que las esferas inmunomagnéticas recubiertas con los anticuerpos específicos utilizadas para esta etapa de concentración sean las adecuadas, según estudios de evaluación publicados en la literatura científica internacional, de preferencia con relación a la microbiología de alimentos. Esta verificación es especialmente importante si este procedimiento no ha sido validado según la NTC 5014.

## **10.    ENUMERACIÓN**

### **10.1   GENERALIDADES**

Al evaluar la calidad microbiológica o la seguridad de los alimentos y los productos alimenticios, o ambos, a menudo no es suficiente saber únicamente cuáles microorganismos están presentes. En la mayoría de los casos, el aspecto cuantitativo es igualmente importante, lo cual origina la necesidad de enumerar los microorganismos. Esto se puede lograr de diversas formas: a través de análisis directo (microscopía), inoculando medios sólidos o líquidos, con citometría de flujo, mediante reacción de la cadena de polimerasa en tiempo real, etc. sin embargo, esta norma únicamente trata de la enumeración utilizando medios líquidos o sólidos.

La enumeración sobre medios sólidos se basa en la capacidad de muchos microorganismos para producir colonias en o sobre el medio de agar que se pueden reconocer como tales a simple vista o con la ayuda de una lupa sencilla. No obstante, si la matriz contiene muchas partículas que pueden interferir con la detección de las colonias, o si el nivel de las bacterias es muy bajo, este principio no se puede utilizar sin separar primero los microorganismos objeto de la matriz (por ejemplo mediante filtración o inmunoseparación). En tales casos, la enumeración con medios líquidos es a menudo una alternativa adecuada.

### **10.2   ENUMERACIÓN USANDO UN MEDIO SÓLIDO**

#### **10.2.1 Generalidades**

La caja de Petri se debería etiquetar con el número de la muestra, la dilución, la fecha y toda información conveniente.

Es recomendable seleccionar las diluciones para garantizar que se obtengan placas que contengan el número adecuado (véase el numeral 10.3.1) y reducir las posibles propiedades inhibitorias.

Utilice una pipeta estéril separada para las transferencias de cada dilución, excepto si se trabaja de la dilución máxima a la mínima.

#### **10.2.2 Cantidad de cajas de Petri por dilución**

Para las técnicas de enumeración en microbiología de alimentos, se debe utilizar una placa por cada dilución con por lo menos dos diluciones sucesivas, para laboratorios que funcionan con aseguramiento de la calidad de acuerdo con los principios de NTC/ISO 17025. Si únicamente se realiza una dilución o si el laboratorio no funciona con aseguramiento de la calidad, entonces se deben utilizar dos placas según se indica en el proyecto de norma DE 060-08.

#### **10.2.3 Técnicas de placa en profundidad**

##### **10.2.3.1 Generalidades**

Retire los volúmenes definidos de la dilución que se va a examinar, tocando la punta de la pipeta contra el lado del tubo para eliminar el exceso de líquido que se adhiere en el exterior. Levante la tapa de la caja de Petri estéril durante el tiempo suficiente para insertar la pipeta, luego dispense el contenido. Vierta el medio de agar fundido a 44 °C hasta 47 °C en cada caja de Petri<sup>2)</sup>. Evite verter el medio fundido directamente sobre el inóculo. Mezcle inmediatamente el medio fundido y el inóculo cuidadosamente para obtener una distribución homogénea de los

---

<sup>2)</sup> Por lo general de 10 ml a 15 ml de agar en cajas de Petri de 90 mm, para obtener un espesor mínimo de 3 mm.

microorganismos dentro del medio. Deje enfriar y solidificar colocando la caja de Petri en una superficie horizontal y fría (el tiempo de solidificación del agar no debe exceder de 10 min.).

Después de retirar el medio de agar fundido del baño de agua, seque la botella con una toalla limpia para evitar que el agua contamine las placas. Evite derramar el medio en la parte externa del recipiente o dentro de la tapa de la placa al realizar el vertido.

Esto puede requerir que el frasco se sostenga en una posición cercana a la horizontal o se evite depositarlo sobre la superficie entre las etapas de vertido.

Si se espera la presencia de colonias dispersas (por ejemplo, *Proteus* spp) en el producto que se va a examinar, recubra las placas solidificadas con agar no nutritivo y estéril o agar idéntico al medio de cultivo utilizado en el ensayo<sup>3)</sup> con el fin de evitar o reducir al mínimo la dispersión.

#### **10.2.4 Inoculación superficial**

##### **10.2.4.1 Generalidades**

Los métodos de vertido en placa diseñados para producir únicamente colonias superficiales sobre las placas de agar tienen ciertas ventajas en comparación con el método de placa vertida. La morfología de las colonias superficiales se observa con facilidad, mejorando la capacidad del analista para diferenciar entre los diferentes tipos de colonias.

Los microorganismos no están expuestos al calor del medio de agar fundido, de forma que se pueden obtener recuentos superiores.

Utilice placas vertidas previamente, con un espesor mínimo de 3 mm del medio de agar, que estén a nivel y sin burbujas de aire ni humedad superficial.

Para facilitar la dispersión uniforme, la superficie del agar solidificado se debería secar según la GTC 78 o según se especifique en la norma internacional pertinente para que el inóculo se absorba en un lapso de 15 min.

##### **10.2.4.2 Método de dispersión con rastrillo (asa de Hockey o bastón)**

Utilizando una pipeta estéril, transfiera el inóculo (por lo general 0,1 ml o 0,5 ml) de la muestra de ensayo líquida o de la suspensión inicial en caso de otras muestras, a la placa de agar (90 mm o 140 mm de diámetro respectivamente). Repita este paso para las siguientes diluciones decimales (las colonias que se van a contar estarán presentes en una fase de dilución de  $10^{-1}$  en el caso del material de muestra líquido y  $10^{-2}$  en el caso de otros materiales de muestra) y, si es necesario, repita para diluciones decimales adicionales.

Si es necesario detectar recuentos microbianos bajos en el caso de algunos productos, el límite de detección se puede incrementar en un factor de 10 al analizar 1,0 ml de la muestra en caso de productos líquidos y 1,0 ml de la suspensión inicial en el caso de otros productos. Para este fin se dispersan 1,0 ml del inóculo ya sea sobre la superficie de una caja de Petri grande (140 mm de diámetro) o sobre las superficies de tres cajas de Petri pequeñas (90 mm de diámetro).

Utilizando un rastrillo de dispersión de vidrio, plástico o acero (por ejemplo elaborada a partir de una barra de vidrio y moldeada como un palo de hockey con diámetro aproximado de 3,5 mm y 20 cm de largo, doblado en ángulos rectos aproximadamente a 3 cm desde un extremo y aplanado en los extremos mediante calentamiento), disperse el inóculo tan rápidamente como sea posible de manera uniforme sobre la superficie de agar sin tocar las paredes laterales de la

---

<sup>3)</sup> Por lo general 5 ml de agar en cajas de Petri de 90 mm.

caja de Petri. Permita que el inóculo se absorba con las cajas tapadas durante 15 min. aproximadamente a temperatura ambiente.

En algunos casos (según se especifique en la norma pertinente), el inóculo se puede depositar sobre una membrana y luego se dispersa como se describió anteriormente.

#### **10.2.4.3 Método de placa en espiral**

##### **10.2.4.3.1 Generalidades**

El método de placa en espiral para determinar el nivel de microorganismos se ha sometido a ensayo en pruebas interlaboratorio con leche, productos lácteos y otros alimentos.

El equipo utilizado - el dispensador en espiral - se describe en el numeral 5.24

##### **10.2.4.3.2 Preparación de la placa de agar**

Se recomienda un dispensador automático con un sistema de entrega estéril para la preparación de las placas de agar, con el fin de ayudar a garantizar que las placas estén a nivel.

Vierta la misma cantidad de agar en todas las placas de manera que se presente la misma altura de agar para la punta del estilete del dispensador en espiral con el fin de mantener el ángulo de contacto correcto.

Como alternativa, se pueden utilizar placas de agar listas para usar preparadas comercialmente.

##### **10.2.4.3.3 Procedimiento de siembra en placa y recuento**

Descontamine la punta del estilete y la tubería extrayendo primero una solución de hipoclorito de sodio (véase el numeral 5.24.4) o el desinfectante recomendado por la casa comercial y luego agua estéril a través del sistema antes de tomar la muestra líquida con el estilete.

Coloque una placa de agar previamente vertida en una caja de Petri sobre la tornamesa y descienda el estilete. La muestra se dispersa de forma diferencial a medida que la punta del estilete recorre la superficie de la placa de agar que va girando. Retire la placa inoculada y vuelva a poner el estilete en su posición de partida. Descontamine el estilete y cárguelo para la inoculación de otra placa.

Después de la incubación, ponga la rejilla de recuento de la placa en espiral en su lugar. Utilice la regla de recuento de 20 para determinar los recuentos. Seleccione cualquier cuña y empiece a contar las colonias desde el borde exterior del primer segmento hacia el centro hasta que se hayan contado 20 colonias. Complete contando las colonias restantes en el segmento que contiene la vigésima colonia. Cuente un área correspondiente en el lado opuesto de la placa y divida el número de colonias contadas en ambos lados por el volumen de la muestra depositado en estas dos áreas. Los volúmenes de la muestra asociados con cada porción de la rejilla de recuento se indican en el manual de operación que acompaña a cada dispensador en espiral.

#### **10.2.5 Incubación**

A menos que se establezca algo diferente en las normas específicas, invierta inmediatamente las cajas una vez han sido inoculadas y colóquelas rápidamente en la incubadora ajustada a la temperatura adecuada. Si se presenta deshidratación excesiva (por ejemplo a 55 °C o en el

caso de una gran circulación de aire), envuelva las cajas de manera laxa en bolsas plásticas antes de la incubación o utilice algún sistema similar con eficiencia equivalente.

Durante el periodo de incubación, algunas variaciones en la temperatura de incubación pueden ser inevitables y aceptables, por ejemplo durante las operaciones usuales de carga y descarga de la incubadora, pero es importante que estos periodos sean mínimos. La duración de estas variaciones se debería monitorear para garantizar que no tienen un efecto significativo en el resultado.

NOTA En algunos casos, puede ser útil tener medios para almacenar las cajas inoculadas a  $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su utilización en comparación con placas inoculadas incubadas al realizar el recuento, con el fin de evitar que partículas confusas del producto sean examinadas como las colonias. También se puede utilizar una lupa binocular para diferenciar a las partículas del producto de las colonias.

En algunas circunstancias, puede ser conveniente para la organización del trabajo en los laboratorios refrigerar las placas inoculadas por un tiempo máximo de 24 h antes de la incubación. Si esto se hace, el laboratorio debe garantizar que esta práctica no afecta los recuentos resultantes.

En general, no se deberían apilar más de seis cajas de Petri para incubación aeróbica y se deberían separar entre sí y de las paredes de la incubadora por lo menos 25 mm. Sin embargo, se pueden aceptar pilas más altas con menor separación en incubadoras equipadas con sistemas de circulación de aire; en este caso, se recomienda verificar la distribución de la temperatura.

Después de la incubación, normalmente las cajas se deberían examinar inmediatamente. Sin embargo, se pueden almacenar, a menos que las normas específicas indiquen algo diferente, hasta durante 48 h en el refrigerador. El almacenamiento refrigerado por periodos más largos sólo es aceptable si se ha demostrado que no tiene efecto en las cantidades, la apariencia o la confirmación posterior de las colonias. Con algunos medios que contienen tintas indicadoras, las placas refrigeradas se deberían dejar en reposo hasta que logren el equilibrio a la temperatura ambiente antes del análisis, con el fin de garantizar que se recupera el color correcto.

### **10.3 CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON EL MEDIO SÓLIDO**

#### **10.3.1 Recuento de colonias**

Después del periodo de incubación establecido en la norma específica, cuente las colonias (colonias totales, colonias típicas o colonias presuntivas) para cada caja que contenga menos de 300 colonias (o cualquier otra cantidad establecida en la norma específica).

Al contar colonias típicas o esperadas, la descripción de las colonias debe ser la que se indica en la norma específica.

En algunos casos, puede ser difícil contar las colonias (por ejemplo cuando están presentes microorganismos dispersos). Considere las colonias dispersas como colonias únicas. Si menos de un cuarto de la caja está saturada por dispersión, cuente las colonias en la parte no afectada de la caja y calcule a partir de ésta la cantidad para la caja completa. Deduzca a partir de éste, mediante extrapolación, la cantidad teórica que correspondería a toda la caja. Si más de un cuarto de la caja está saturado, deseche el recuento. Considere las colonias dispersas en forma de cadenas como una colonia.

En los diversos métodos de cálculo que se indican en el numeral 10.3.2, se debe tener en cuenta las cajas que no contienen colonias, cuando dichas cajas se han retenido.

Cuando se ha utilizado un dispensador en espiral, el recuento de colonias se hace tal como se describe en el numeral 10.2.4.3.3.

### **10.3.2 Expresión de los resultados**

#### **10.3.2.1 Generalidades**

**10.3.2.1.1** Los casos de los que trata este numeral son casos generales:

- inoculación de una caja de Petri con 90 mm de diámetro por cada dilución;
- cantidad máxima de recuentos para las colonias totales presentes: 300 por cada caja,
- cantidad total máxima de colonias (típicas y atípicas) presentes en una caja cuando se cuentan colonias típicas o esperadas: de preferencia 300 por cada caja;
- cantidad máxima de recuentos para colonias típicas o esperadas: 150 por cada caja;
- cantidad de colonias presuntivas inoculadas para la identificación o la confirmación (véase el numeral 10.3.2.3) en cada caja: en general 5.

Estas cifras se definen en las normas específicas.

Cuando se utilizan cajas con diámetros diferentes de 90 mm, la cantidad máxima de colonias se debe incrementar o reducir en proporción al área superficial de las cajas (o las membranas).

**10.3.2.1.2** Los métodos de cálculo que se presentan a continuación corresponden a los casos que ocurren con más frecuencia cuando los ensayos se realizan según las buenas prácticas de laboratorio. Ocasionalmente se pueden presentar casos especiales (por ejemplo, la relación de los factores de dilución utilizada para dos diluciones sucesivas puede ser muy diferente) y, por lo tanto, es necesario que los resultados de los recuentos obtenidos sean examinados e interpretados por un microbiólogo calificado y, si es necesario, sean rechazados.

#### **10.3.2.2 Método de cálculo: caso general (recuento de colonias totales o colonias típicas)**

Para que un resultado sea válido, por lo general se considera necesario contar las colonias por lo menos en una caja que contenga 10 colonias como mínimo [colonias totales, colonias típicas o colonias que cumplan con los criterios de identificación (véase el numeral 10.3.2.3)].

Calcule la cantidad  $N$  de microorganismos presentes en la muestra de ensayo como un promedio ponderado a partir de dos diluciones sucesivas utilizando la Ecuación (1):

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d} \quad 1)$$

en donde

$\sum C$  es la suma de colonias contadas en las dos cajas conservadas provenientes de dos diluciones sucesivas, por lo menos una de las cuales contiene un mínimo de 10 colonias;

$V$  es el volumen de inóculo puesto en cada caja, en mililitros;

$d$  es la dilución correspondiente a la primera dilución retenida o seleccionada [ $d=1$  cuando se retiene el producto líquido sin diluir (muestra de ensayo)].

Aproxime el resultado calculado hasta dos cifras decimales. Al hacer esto, si la tercera cifra es inferior a 5, no modifique la cifra precedente; si la tercera cifra es superior o igual a 5, incremente la cifra precedente en una unidad.

Expresa el resultado preferiblemente como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por la potencia correspondiente de 10, o un número entero con dos cifras decimales

Reporte el resultado como el número  $N$  de microorganismos por mililitro (productos líquidos) o por gramo (otros productos).

EJEMPLO El recuento ha producido los siguientes resultados:

- en la primera dilución retenida ( $10^{-2}$ ): 168 colonias;
- en la segunda dilución retenida ( $10^{-3}$ ): 14 colonias.

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d} = \frac{168 + 14}{1 \times 1,1 \times 10^{-2}} = \frac{182}{0,011} = 16\ 545$$

Aproximando los resultados como se especificó arriba, el número de microorganismos es 17 000 o  $1,7 \times 10^4$  por mililitro o por gramo de producto.

### 10.3.2.3 Método de cálculo: después de la identificación

Cuando el método utilizado requiere de identificación, se identifica un número determinado  $A$  (por lo general 5) de colonias presuntivas a partir de cada una de las cajas retenidas para el recuento de colonias. Después de la identificación, calcule para cada caja el número  $a$  de colonias que cumplen con los criterios de identificación, utilizando la Ecuación (2):

$$a = \frac{b}{A} \times C \quad 2)$$

en donde

$b$  = es el número de colonias que cumplen con los criterios de identificación entre las colonias identificadas  $A$ ;

$C$  = es el número total de colonias presuntivas contadas en la caja.

Aproxime el resultado calculado hasta el número entero más próximo. Al hacerlo, si la primera cifra después del punto decimal es inferior a 5, no modifique la cifra precedente; si la primera cifra después del punto decimal es superior o igual a 5, incremente la cifra precedente en una unidad.

Calcule el número  $N$  de microorganismos identificados presentes en la muestra de ensayo reemplazando  $\sum C$  por  $\sum a$  por  $a$  en la ecuación indicada en el numeral 10.3.2.2.

Aproxime al resultado tal como se especifica en el numeral 10.3.2.2.

Expresa el resultado tal como se especifica en el numeral 10.3.2.2.

EJEMPLO El recuento ha producido los siguientes resultados:

- en la primera dilución retenida o seleccionada ( $10^{-3}$ ): 66 colonias;
- en la segunda dilución retenida o seleccionada ( $10^{-4}$ ): cuatro colonias.

Se realizó el ensayo de las colonias seleccionadas así:

- de la 66 colonias, ocho se sometieron a ensayo, 6 de las cuales cumplieron con los criterios, entonces  $a = 50$ ;
- de las 4 colonias, las 4 cumplieron con los criterios, entonces  $a = 4$ .

$$N = \frac{\sum a}{V \times 1,1 \times d} = \frac{50 + 4}{1 \times 1,1 \times 10^{-3}} = \frac{54}{1,1 \times 10^{-3}} = 49\ 090$$

Aproximando el resultado tal como se especifica en el numeral 10.3.2.2, la cantidad de microorganismos es 49 000 o  $4,9 \times 10^4$  por mililitro o por gramo de producto.

#### **10.3.2.4 Método de cálculo: recuentos bajos**

##### **10.3.2.4.1 Caso en el cual la caja (muestra de ensayo, suspensión inicial o primera dilución) contiene menos de 10 colonias**

Los recuentos desde 10 hasta el límite superior (práctico) de cada método se encuentran en el rango óptimo de precisión. Sin embargo, la precisión disminuye rápidamente a medida que la cantidad que colonias disminuye por debajo de 10. Dependiendo del propósito de ensayo, un límite más bajo de determinación se puede definir como se indica a continuación para recuentos inferiores a 10.

Según la norma ISO/TR 13843, la definición del límite de determinación es: "concentración más baja promedio de partículas  $x$  por porción analítica donde la incertidumbre estándar relativa esperada es igual a un valor especificado (RSD)". El valor RSD es la desviación estándar relativa, la cual se calcula dividiendo la estimación de la desviación estándar  $s$  para una población proveniente de una muestra por el promedio  $\bar{x}$  para dicha muestra. En lugar de RSD se utilizará el símbolo  $w$  para la desviación estándar relativa. De este modo,  $w = s/\bar{x}$

En el caso de una distribución de Poisson,  $x$  se calcula mediante la ecuación:

$$x = \frac{1}{(w)^2} \quad 3)$$

Si  $w$  se ajusta en 50 % como el límite de precisión relativa aceptable (lo cual parece ser razonable en microbiología), el límite inferior de determinación será el número de colonias dado por:

$$x = \frac{1}{(0,50)^2} = 4$$

De este modo, los resultados basados en recuentos inferiores a cuatro se deberían tratar como una pura detección de la presencia de microorganismos.

En resumen:

Si la placa contiene menos de 10 colonias, pero por lo menos 4, calcule el resultado como se indica para el caso general (10.3.2.2) y repórtelo como el número estimado  $\bar{x}$  de microorganismos por mililitro (productos líquidos) o por gramo (otros productos).

Si el total es de 3 a 1, la precisión del resultado es muy baja y el resultado se debe reportar como:

"Están presentes los microorganismos pero en cantidad inferior a  $(4 \times d)$  por gramo o ml".

#### **10.3.2.4.2 Caso en el cual la caja (muestra de ensayo, suspensión inicial o primera dilución) no contiene colonias**

Si la caja que contiene la muestra de ensayo (productos líquidos), la suspensión inicial (otros productos) o la primera dilución inoculada o retenida no contiene colonias, reporte del resultado de la siguiente manera.

"Menos de  $1/d$  microorganismos por mililitro" (productos líquidos) o "menos de  $1/d$  microorganismos por gramo" (otros productos).

Donde  $d$  es el factor de dilución de la suspensión inicial o de la primera dilución inoculada o retenida ( $d = 10^0 = 1$  cuando se retiene la muestra de ensayo del producto líquido inoculada directamente).

#### **10.3.2.4.3 Casos especiales**

##### **10.3.2.4.3.1 Generalidades**

Estos casos involucran el recuento de colonias típicas o presuntivas.

##### **10.3.2.4.3.2 Caso 1**

Si la cantidad de colonias típicas y atípicas en la caja que contiene la primera dilución  $d_1$  es superior a 300 (o cualquier otra cantidad establecida en la norma específica), con colonias típicas o colonias confirmadas visibles, y si la caja que contiene la siguiente dilución  $d_2$  contiene menos de 300 colonias (o cualquier otra cantidad establecida en la norma específica), y ninguna colonia típica o confirmada es visible, reporte el resultado de la siguiente manera:

"Menos de  $1/d_2$  y más de  $1/d_1$  microorganismos por mililitro" (productos líquidos) o "menos de  $1/d_2$  y más de  $1/d_1$  microorganismos por gramo" (otros productos).

en donde  $d_1$  y  $d_2$  son los factores de dilución correspondientes a la dilución  $d_1$  y  $d_2$ .

EJEMPLO    El recuento ha producido los siguientes resultados:

- en la primera dilución retenida ( $10^{-2}$ ): más de 300 colonias en la caja, con presencia de colonias típicas o confirmadas,
- en la segunda dilución retenida ( $10^{-3}$ ): 33 colonias, sin presencia de colonias típicas o confirmadas.

El resultado, expresado en microorganismos, es inferior a 1 000 y superior a 100 por mililitro o por gramo de producto.

##### **10.3.2.4.3.3 Caso 2\***

Si la cantidad de colonias típicas y atípicas en la caja que contiene la primera dilución  $d_1$  es superior a 300 (o cualquier otra cantidad establecida en la norma específica), sin colonias típicas o confirmadas visibles, y si la caja que contiene la siguiente dilución  $d_2$  contiene menos de 300 colonias (o cualquier otra cantidad establecida en la norma específica,) y ninguna colonia típica o confirmada es visible, reporte el resultado de la siguiente manera:

"Menos de  $1/d_2$  microorganismos por mililitro" (productos líquidos) o "menos de  $1/d_2$  microorganismos por gramo" (otros productos).

en donde  $d_2$  es el factor de dilución correspondiente a la dilución  $d_2$ .

EJEMPLO El recuento ha producido los siguientes resultados:

- en la primera dilución retenida ( $10^{-2}$ ): más de 300 colonias en la caja, sin presencia de colonias típicas o confirmadas;
- en la segunda dilución retenida ( $10^{-3}$ ): 33 colonias, sin presencia de colonias típicas o confirmadas.

El resultado, expresado en microorganismos, es inferior a 1 000 por mililitro o por gramo de producto.

\* *Este tipo de reporte debe tenerse en cuenta cuando en la dilución 10-2 se presenten más de 300 colonias atípicas que impidan la visualización de las colonias típicas siempre y cuando en la dilución 10-3 no se evidencien colonias típicas.*

### 10.3.2.5 Método de cálculo: casos especiales

**10.3.2.5.1** Cuando el número de colonias contadas (colonias totales, colonias típicas o colonias presuntiva) es superior a 300 (o cualquier otra cantidad establecida en la norma específica) para la caja que contiene la primera dilución  $d_1$ , con un número de colonias (colonias totales, colonias típicas o colonias que cumplen con los criterios de identificación) de menos de 10 para la caja que contiene la siguiente dilución  $d_2$ :

- si el número de colonias para la caja que contiene la dilución  $d_1$  está en el intervalo entre 334 y 300 (la parte superior del intervalo de confianza para un promedio ponderado igual a 300), utilice el método de cálculo para los casos generales (véase el numeral 10.3.2.2);
- si la cantidad de colonias para la caja que contiene la dilución  $d_1$  es superior a 334 (la parte superior del intervalo de confianza para un promedio ponderado igual a 300), sólo tome en cuenta el resultado del recuento de la dilución  $d_2$  y calcule un recuento estimado (véase el numeral 10.3.2.4), excepto cuando se ha establecido un máximo de 300 para el recuento de la colonia, si este recuento estimado es inferior a 8 (límite inferior del intervalo de confianza para un promedio ponderado igual a 10), dado que la diferencia entre las dos diluciones es inaceptable.

Las cifras correspondientes a los intervalos de confianza se deben adaptar a la cantidad máxima establecida para los recuentos de colonias.

EJEMPLO 1 El recuento ha producido los siguientes resultados:

- en la primera dilución retenida ( $10^{-2}$ ): 310 colonias;
- en la segunda dilución retenida ( $10^{-3}$ ): 8 colonias.

Utilice el método de cálculo para casos generales usando las cajas para las dos diluciones retenidas.

EJEMPLO 2 El recuento ha producido los siguientes resultados:

- en la primera dilución retenida ( $10^{-2}$ ): más de 334 colonias en la caja;
- en la segunda dilución retenida ( $10^{-3}$ ): 9 colonias.

Reporte un recuento estimado con base en las colonias contadas en la caja para la dilución  $10^{-3}$ .

EJEMPLO 3 El recuento (cuando se ha establecido una cantidad máxima de 300 para el recuento de colonias) ha producido los siguientes resultados:

- en la primera dilución retenida ( $10^{-2}$ ): más de 334 colonias en la caja;
- en la segunda dilución retenida ( $10^{-3}$ ): 7 colonias.

El resultado de este recuento es inaceptable.

EJEMPLO 4 El recuento (cuando se ha establecido una cantidad máxima de 150 para el recuento de colonias) ha producido los siguientes resultados:

- en la primera dilución retenida ( $10^{-2}$ ): más de 167 colonias en la caja (límite superior del intervalo de confianza con un promedio ponderado igual a 150);
- en la segunda dilución retenida ( $10^{-3}$ ): 7 colonias.

Reporte un recuento estimado con base en las colonias contadas en la caja para la dilución  $10^{-3}$ .

**10.3.2.5.2** Cuando el recuento de colonias (colonias totales, colonias típicas o colonias presuntivas) para cada una de las cajas para todas las diluciones inoculadas produce un número superior a 300 (o cualquier otra cantidad establecida en la norma específica), reporte del resultado de la siguiente manera:

"Más de  $300/d$ " (en el caso de colonias totales o colonias típicas) o " $300 \times b/A \times 1/d$ " (en el caso de colonias confirmadas), expresado en microorganismos por mililitro (productos líquidos) o microorganismos por gramo (otros productos).

en donde

$d$  = es la dilución de la última dilución inoculada;

$b$  = es el número de colonias que cumplen con los criterios de identificación entre las colonias presuntivas  $A$ .

**10.3.2.5.3** Cuando la caja que contiene la última dilución inoculada tiene más de 10 colonias y menos de 300 colonias (o cualquier otra cantidad establecida en la norma específica) (colonias totales, colonias típicas o colonias presuntivas), calcule el número  $N'$  de microorganismos presentes utilizando la Ecuación (4):

$$N' = \frac{c}{V \times d} \quad 4)$$

en donde

$c$  = es el número de colonias contadas en la caja;

$V$  = es el volumen del inóculo utilizado en cada caja, en mililitros;

$d$  = es la dilución correspondiente a la dilución retenida.

Aproxime el resultado tal como se especifica en el numeral 10.3.2.2.

Reporte en el resultado como el número  $N'$  de microorganismos por mililitro (productos líquidos) o por gramo (otros productos).

EJEMPLO El recuento ha producido los siguientes resultados.

- en la última dilución inoculada ( $10^{-4}$ ): 120 colonias.

$$\text{Entonces } N' = \frac{120}{1 \times 10^{-4}} = 1\,200\,000$$

Aproxime el resultado tal como se especifica en el numeral 10.3.2.2, el número  $N'$  de microorganismos es 1 200 000 o  $1,2 \times 10^6$  por mililitro o por gramo de producto

### **10.3.2.6 Medición de la incertidumbre**

Con respecto a las determinaciones cuantitativas, véase la norma ISO/TS 19036.

## **10.4 ENUMERACIÓN DE MOHOS Y LEVADURAS**

### **10.4.1 Generalidades**

Las levaduras y los mohos usualmente se deberían enumerar bien sea mediante la técnica de placa en profundidad la cual permite una enumeración más fácil o mediante la técnica de placa con dispersión superficial que proporciona una exposición máxima de las células al oxígeno atmosférico y evita el esfuerzo por calor proveniente del agar derretido. Se recomienda secar las placas de agar previamente vertidas antes de su inoculación (véase la GTC 78).

Algunas levaduras y mohos pueden ser infecciosas o producir respuestas alérgicas, a veces incluso en individuos sanos. Por esto, es importante ser razonablemente precavido cuando se trabaja con ellos. Idealmente, las placas se deberían conservar en incubadoras, no en un recinto abierto. Es recomendable retirar las tapas de las placas con muy poca frecuencia, en la medida de lo posible, normalmente sólo para los propósitos esenciales tales como la preparación de un portaobjetos para análisis microscópico. Las asas sometidas a llama se deberían enfriar antes de realizar las transferencias con el fin de evitar la dispersión de conidias y otras células. Los mesones de trabajo y las incubadoras se deberían desinfectar de forma rutinaria.

Es aconsejable incubar las cajas de Petri sin invertir y sin manipular hasta que las placas estén listas para el recuento, dado que el movimiento puede originar la liberación de conidias o esporas de los mohos con el desarrollo posterior de colonias satélites, lo que proporciona una sobreestimación de la población.

### **10.4.2 Recuento de mohos y levaduras**

Por lo general, se cuentan las placas que tengan de 10 a 150 colonias. Si la micoflora consiste principalmente en mohos, seleccione las cajas que tengan recuentos en el rango de menor población; si la micoflora consiste principalmente en levaduras, las cajas que tengan recuentos hasta el límite superior se pueden seleccionar para el mismo.

Si la identidad de las colonias es dudosa, examine portaobjetos húmedos o tinciones de células de por lo menos cinco colonias por cada muestra para confirmar que no haya presencia de bacterias.

## **10.5 ENUMERACIÓN UTILIZANDO UN MEDIO LÍQUIDO**

### **10.5.1 Principio**

Las porciones de ensayo se inoculan en un medio líquido diseñado para dar soporte al crecimiento de un microorganismo particular o un grupo de microorganismos, y con frecuencia inhibe la proliferación de los microorganismos que no son objeto.

Con el fin de determinar si se ha presentado crecimiento de los microorganismos objeto, se pueden utilizar varios criterios como por ejemplo la detección visual de la turbidez, la

producción de gas, los cambios en el color, el aislamiento posterior de los microorganismos en un medio de agar selectivo. La composición del medio de crecimiento y los criterios para discriminar entre un resultado positivo y uno negativo se definen en las normas correspondientes.

Usando este enfoque, únicamente un valor cualitativo se puede atribuir a cada porción de ensayo, es decir el resultado es un positivo o negativo. Para obtener una estimación de la cantidad de microorganismos que está presente, es necesario examinar varias porciones de ensayo y utilizar procedimientos estadísticos para determinar el número más probable (NMP).

## **10.5.2 Inoculación**

### **10.5.2.1 Generalidades**

Si se utiliza un medio de crecimiento selectivo, la adición de la porción de ensayo no debería reducir sus propiedades selectivas (lo que permitiría el crecimiento de microorganismos que no son objeto). En la mayoría de las normas se describe en el alcance la información acerca de la compatibilidad de una matriz específica y del medio líquido, pero se debería tener cuidado con matrices como especias, cacao, pastillas de caldo, etc., ya que pueden contener sustancias que inhiben el crecimiento, las cuales requieren de la adición de componentes neutralizantes, el uso de factores de dilución mayores, centrifugación, filtración, o separación inmunomagnética para separar los organismos objeto de la matriz, aunque esto no siempre se define específicamente en las normas correspondientes. La incompatibilidad también se puede deber a la composición biológica de la matriz: muestras ambientales altamente contaminadas, productos fermentados o productos con bacterias probióticas obviamente representan un reto mayor para el microbiólogo analista que las muestras que sólo contienen pocos microorganismos. Para estas matrices con interferencias, se recomienda realizar experimentos de adición utilizando microorganismos representativos con el fin de verificar que el método es realmente compatible con la matriz.

### **10.5.2.2 Procedimiento**

A menos que las normas correspondientes establezcan algo diferente, los volúmenes de la porción de ensayo inferiores o iguales a 1 ml normalmente se adicionan a 5 hasta 10 veces el volumen del medio con una concentración simple. Las porciones de ensayo entre 1 ml y 100 ml por lo general se adicionan a volúmenes iguales del medio con doble concentración.

Para volúmenes superiores a 100 ml, se pueden utilizar medios más concentrados. Para propósitos especiales, los medios estériles deshidratados pueden disolverse en la muestra fría (o precalentada a 30° C) que se va a analizar.

A menos que se indique otra cosa, el tiempo transcurrido entre la preparación de la primera dilución de la muestra y la inoculación del último tubo, placa con celdas múltiples o frasco, debería ser inferior a 15 min.

Para cada dilución se debe utilizar una pipeta nueva y estéril.

### **10.5.3 Elección del sistema de inoculación**

La esencia del método del número más probable (NMP) es la dilución de una muestra hasta tal grado que el inóculo, en ocasiones pero no siempre, contiene microorganismos viables. El "resultado", es decir el número de inóculos que producen crecimiento en cada dilución, proporcionará una estimación de la concentración inicial de bacterias en la muestra. Con el fin de obtener estimaciones en un rango amplio de concentraciones posibles, los microbiólogos

utilizan diluciones en serie, incubando varios tubos (o placas, etc.) de cada dilución. El NMP de microorganismos presentes en la muestra original y la precisión de la estimación se pueden calcular mediante procedimientos estadísticos con base en los números de tubos positivos y negativos observados después de la incubación.

Elija entre varias configuraciones de NMP disponibles de acuerdo con:

- el número esperado de microorganismos en la muestra que se somete a investigación,
- los requisitos reglamentarios,
- la precisión necesaria, y
- cualquier otra consideración práctica.

La incertidumbre de la medición depende de la cantidad de porciones de ensayo positivas observadas en una forma aproximadamente similar ya que la incertidumbre de la medición de un recuento de colonias depende de la cantidad de colonias en la placa. La incertidumbre de la medición aumenta en función de la raíz cuadrada del número de tubos utilizados. El número de tubos se debe cuadruplicar para reducir a la mitad la incertidumbre de la medición. Cuando se utilizan sistemas que tienen pocos tubos replicados, la incertidumbre de la medición es baja.

Dependiendo de su tamaño, las porciones de ensayo se pueden inocular en tubos o en frascos que contengan la cantidad exigida del medio líquido. Para porciones de ensayo pequeñas, también se pueden utilizar las placas con celdas múltiples.

#### **10.5.3.1 Sistema de dilución única**

Cuando la concentración esperada de microorganismos es pequeña o se espera que varíe sólo moderadamente, el sistema más adecuado de inoculación es una serie única de porciones de ensayo iguales. Cuando la relación esperada entre la cantidad máxima y mínima de microorganismos es inferior a aproximadamente 25, diez porciones de ensayo paralelas es la cantidad más pequeña que se espera que funcione; con 50 tubos paralelos, una relación de 200 es el límite. En el Anexo B, Tablas B.1 a B.4, se indican ejemplos de NMP de dilución única.

#### **10.5.3.2 Sistema de dilución múltiple**

Cuando la concentración de microorganismos en la muestra es desconocida, o si se anticipa una mayor variación, puede ser necesario inocular series de tubos provenientes de varias diluciones. Inocule una cantidad suficiente de diluciones para garantizar un sistema tanto con resultados positivos como negativos. El número de diluciones también depende del método de cálculo utilizado para estimar el valor NMP. Si es necesario utilizar tablas, entonces los resultados de tres diluciones deben estar disponibles y las configuraciones de los sistemas se limitan a aquellas disponibles en las tablas. Con programas de computador, los números de las diluciones y los tubos paralelos no tienen restricción.

#### **10.5.3.3 Sistema de dilución simétrica**

El sistema NMP simétrico aplicado más comúnmente utiliza tres o cinco tubos paralelos por cada dilución. La precisión que se obtiene con este sistema disminuye rápidamente con cantidades menores de tubos por dilución. Los resultados provenientes de un diseño con tres tubos son escasamente indicaciones del orden de magnitud de la concentración. Si se requiere de mayor precisión, se recomienda que se seleccionen cinco o más tubos paralelos. Ejemplos

de un NMP con tres tubos y un NMP con cinco tubos se indican en el Anexo B, Tablas B.5 y B.7 respectivamente.

#### **10.5.3.4 Sistema de dilución asimétrica**

En sistemas asimétricos, los diferentes niveles de dilución no tienen el mismo número de tubos. Utilice estos sistemas únicamente para estimar las cantidades de microorganismos en un rango bien definido. Con respecto a los ejemplos, consulte el proyecto de norma DE 060-08.

#### **10.5.4 Incubación**

Incube los tubos, matraces o frascos inoculados en una incubadora o en un baño de agua. Coloque las placas con celdas múltiples en una incubadora.

Seleccione la duración y la temperatura de incubación según referencia a un método normal específico, dado que estos valores dependen del microorganismo o grupo de microorganismos que se busca.

Para algunos organismos, puede ser necesario un procedimiento de incubación en dos etapas o una etapa de confirmación, o ambas. Con respecto a los detalles, consulte las normas específicas.

#### **10.5.5 Interpretación de los resultados**

Los criterios que diferencian los resultados positivos de los negativos varían con cada microorganismo o grupo de microorganismos y se definen en las normas correspondientes. Al utilizar estos criterios, cuente y registre la cantidad de resultados positivos obtenidos con todas las porciones de ensayo derivadas de una muestra.

#### **10.5.6 Determinación de los valores NMP**

Existen tres posibilidades diferentes para determinar el valor NMP: el cálculo con fórmulas matemáticas, la consulta de tablas de NMP o la utilización de programas específicos de computador. Asumiendo que se basan en las mismas consideraciones estadísticas, son igualmente válidas. Estos tres métodos se detallan a continuación.

##### **10.5.6.1 Formulas matemáticas**

###### **10.5.6.1.1 Fórmula aproximada para todos los casos**

Los valores NMP aproximados para cualquier número de diluciones y tubos paralelos se derivan mediante la aplicación de la siguiente ecuación (adaptada de la referencia [36]):

$$MPN = \frac{Z_p \times m_r}{\sqrt{m_s \times m_t}}$$

en donde

$Z_p$  es el número de tubos positivos;

$m_r$  es la masa de referencia de la muestra, en gramos;

$m_s$  es la masa total de la muestra en todos los tubos con reacciones negativas, en gramos;

$m_t$  es la masa total de la muestra en todos los tubos, en gramos.

El valor NMP se expresa para cada masa de referencia de la muestra, en gramos (usualmente 1 g, algunas veces 100 g).

#### 10.5.6.1.2 Solución "exacta" de una serie de tubos

El valor NMP para una sola serie de tubos se deriva a partir de la siguiente fórmula:

$$MPN = \frac{m_r}{m_m} \ln \left[ \frac{n}{n - z_p} \right]$$

en donde

- $m_r$  = es la masa de referencia de la muestra, en gramos,
- $m_m$  = es la masa de la muestra en cada tubo de la serie, en gramos;
- $\ln$  = es el logaritmo natural;
- $n$  = es el número de tubos en la serie;
- $z_p$  = es el número de tubos con una reacción positiva.

#### 10.5.6.1.3 Ensayos de dilución única con precisión estimada

Los límites de confianza al 95 % del NMP estimado se pueden calcular aproximadamente utilizando la siguiente ecuación:

$$x = \frac{m_r}{m_m} \ln \left[ \frac{n}{z_n \pm 2 \sqrt{\frac{z(n - z_n)}{n}}} \right]$$

en donde

- $x$  = es el límite de confianza de 95 % superior o inferior;
- $m_r$  = es la masa de referencia de la muestra, en gramos,
- $m_m$  = es la masa de la muestra en cada tubo de la serie, en gramos;
- $\ln$  = es el logaritmo natural;
- $n$  = es el número de tubos de la serie;
- $z_n$  = es el número de tubos con una reacción **negativa**.

El signo más se asocia con el límite inferior y el signo menos con el límite superior. La aproximación no es muy buena cuando la mayoría de los tubos son negativos (estériles), pero mejora cuando aumenta la proporción de tubos positivos.

#### 10.5.6.1.4 Ensayos de dilución múltiple simétrica con precisión estimada

La incertidumbre estándar de  $\log_{10}$  de un sistema NMP de dilución múltiple simétrica se puede obtener a partir de la ecuación aproximada de Cochran<sup>[28]</sup>:

$$SE = 0,58 \sqrt{\frac{\log_{10} f}{n}}$$

en donde

$SE$  = es el error estándar del NMP  $\log_{10}$ ;

$f$  = es el factor de dilución entre diluciones consecutivas (en la mayoría de los casos es 10);

$n$  = es el número de tubos por cada dilución.

Los límites superior e inferior de confianza al 95 % se pueden aproximar multiplicando y dividiendo el NMP estimado por el antilogaritmo de  $2 \times SE$  respectivamente. Este procedimiento tiende a exagerar el límite de confianza superior.

### 10.5.6.2 Tablas de NMP

#### 10.5.6.2.1 Tablas para sistemas de dilución única

Las Tablas B.1 a B.4 (Anexo B) indican los valores de NMP y los intervalos de confianza del 95 % para cada porción de ensayo, para 10, 15, 20 y 25 tubos paralelos [cada tubo se inocula con la misma dilución (única)].

Para expresar el resultado por masa de referencia de la muestra (o volumen para muestras líquidas), multiplique el NMP y los valores del límite al 95 % por la relación masa de referencia/masa de la porción de ensayo. No multiplique la incertidumbre estándar logarítmica. La masa de referencia en microbiología de alimentos por lo general es de 1 g. La masa de la porción de ensayo corresponde a la cantidad de la muestra (en gramos) que está presente en el volumen utilizado para inocular los tubos, por ejemplo 0,1 g si se ha utilizado 1 ml del homogenizado de  $10^{-1}$ .

NOTA Reportar en NMP de acuerdo a la legislación nacional vigente.

EJEMPLO (Referencia [30])

Veinte tubos con caldo de doble potencia se inocularon con alícuotas de 5 ml de una muestra diluida 10 veces (0,1 g/ml). Después de la incubación, 16 de los tubos presentaron crecimiento visible. ¿Cual fue la densidad bacteriana más probable (organismos por gramo) en la muestra? La Tabla B.3 indica 1,61 como el número más probable de organismos por cada tubo, con un límite inferior al 95 % de 0,93 y un límite superior al 95 % de 2,77.

Cada tubo recibió una porción de ensayo de 5 ml, la cual corresponde a 0,5 g de la muestra. Por lo tanto, el número más probable de microorganismos en 1 g de muestra está dado por:

$$MPN = \frac{1,61}{0,5} \text{ por gramo} = 3,2 \text{ por gramo}$$

Con un intervalo de confianza al 95 % con un rango entre:

$$\text{Límite inferior al 95\%} = \frac{0,93}{0,5} \text{ por gramo} = 1,9 \text{ por gramo}$$

$$\text{Límite superior al 95\%} = \frac{2,77}{0,5} \text{ por gramo} = 5,5 \text{ por gramo}$$

#### 10.5.6.2.2 Tablas para sistemas de dilución múltiple: tres diluciones sucesivas

Con sistemas simétricos, es una práctica común utilizar tres diluciones sucesivas con tres (véase la Tabla B.5) o cinco (véase la Tabla B.7) replicados. Registre el número de resultados positivos para cada grupo de tubos y, a partir de la tabla de NMP para el sistema de

inoculación utilizado, lea el número más probable de microorganismos presentes en el volumen de referencia de la muestra.

Es probable que se presenten más algunas combinaciones de tubos que otras. Por ejemplo, es mucho menos probable que se presente una combinación de resultados positivos de 0, 0, 3 que una combinación de 3, 2, 1. Para cuantificar esta probabilidad, a todas las combinaciones de resultados positivos se les ha atribuido una categoría, que va desde 0 hasta 3. Un resultado de categoría 1 es un resultado con mayor probabilidad, mientras que un resultado de categoría 3 es raro y puede no ser reproducido con facilidad. Los casos más desfavorables son los resultados de categoría 0; éstos se deberían considerar con gran desconfianza. Asumiendo que los resultados del análisis son correctos, se debería esperar que 95 % de las combinaciones observadas estén en la categoría 1, 4 % en la categoría 2, 0,9 % en la categoría 3 y únicamente 0,1 % en la categoría 0. Las categorías se explican en más detalle en la Tabla B.6.

Cuando se hacen más de tres diluciones, la selección de la combinación "correcta" de tres diluciones consecutivas no siempre es muy clara. Sin embargo, esto se puede hacer con facilidad al registrar todas las combinaciones posibles de tubos positivos y al leer la categoría correspondiente en la Tabla B.5.

A partir de aquí, aplique las siguientes reglas:

- 1) Seleccione la combinación de tres diluciones consecutivas que tengan un perfil de categoría 1 para obtener el índice del NMP. Si se obtiene más de una combinación con perfil de categoría 1, utilice aquella con el mayor número de tubos positivos.
- 2) Si no se dispone de ninguna combinación con perfil de categoría 1, utilice aquella que tenga perfil de categoría 2. Si se obtiene más de una combinación con perfil de categoría 2, utilice aquella con el mayor número de tubos positivos.
- 3) Si no se dispone de una combinación con perfil de categoría 2, utilice aquella que tenga perfil de categoría 3. Si se obtiene más de una combinación con perfil de categoría 3, utilice aquella con el mayor número de tubos positivos.

En la Tabla 1 se presentan algunos ejemplos.

**Tabla 1. Ejemplo de la selección de resultados positivos para el cálculo del NMP**

Muestra	Número de tubos positivos obtenidos a partir de tres tubos incubados para las siguientes cantidades de muestra inoculada por cada tubo <sup>a</sup>					NMP <sup>b</sup>	
	Producto líquido: 10 ml	1 ml	10 <sup>-1</sup> ml	10 <sup>-2</sup> ml	10 <sup>-3</sup> ml	Producto líquido (ml <sup>-1</sup> )	Otros productos (g <sup>-1</sup> )
	Otros productos: 1 g	10 <sup>-1</sup> g	10 <sup>-2</sup> g	10 <sup>-3</sup> g	10 <sup>-4</sup> g		
1	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	1	0	1,1 x 10 <sup>1</sup>	1,1 x 10 <sup>2</sup>
2	3	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>		2,4 x 10 <sup>1</sup>	2,4 x 10 <sup>2</sup>
3	2	2	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	7,4	7,4 x 10 <sup>1</sup>
4	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	0	0	2,4	2,4 x 10 <sup>1</sup>
5	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	1	0	2,1 x 10 <sup>-1</sup>	2,1

<sup>a</sup> El subrayado indica la combinación seleccionada.  
<sup>b</sup> Calculado utilizando el índice de NMP (véase la Tabla B.5).

### **10.5.6.3 Programas de computador**

Los programas de computador más versátiles no imponen restricciones con respecto a las cantidades de diluciones y tubos paralelos ni a la simetría del sistema NMP. En el mercado se encuentran disponibles algunos programas estadísticos (véase la referencia [29]).

### **10.5.7 Expresión de los resultados**

A partir de la lectura del índice de NMP de la Tabla B.5 [según la combinación de tres (o cinco) diluciones consecutivas retenidas], determine los microorganismos más probables en el volumen de referencia.

Informe los resultados como el número más probable de microorganismos (o grupo específico de microorganismos) por gramo o por mililitro. La masa o el volumen de referencias pueden ser diferentes de gramos o mililitros (por ejemplo 100 g o 100 ml).

## **11.      MÉTODO DE DETECCIÓN (MÉTODO CUALITATIVO)**

### **11.1      GENERALIDADES**

Un método de detección es aquel que determina la presencia o ausencia de microorganismos particulares en una cantidad determinada de producto.

### **11.2      PRINCIPIO**

A menos que la norma internacional correspondiente indique algo diferente, mezcle (productos líquidos) u homogenice (otros productos) una cantidad  $P$  del producto que se va a examinar con  $9 \times P$  ml o  $9 \times P$  g de un caldo opcional o selectivo, o ambos.

Con el fin de facilitar la recuperación de los microorganismos estresados en los alimentos, usualmente se realiza un preenriquecimiento en un caldo no selectivo seguido de enriquecimiento selectivo y aislamiento sobre un medio de agar selectivo/diferencial. El uso de dos caldos de enriquecimiento diferentes, así como dos o más medios de agar selectivos, incrementa la sensibilidad del método.

Después de la incubación, disperse una asada del cultivo obtenido sobre la superficie de un medio de agar selectivo de manera tal que se obtengan colonias aisladas. A menos que se indique algo diferente, los caldos de enriquecimiento incubados sólo se pueden refrigerar después de la evaluación del impacto de la refrigeración en los resultados y únicamente si el informe de ensayo lo estipula claramente.

Posteriormente se identifica la cantidad (generalmente cinco por cada placa de agar) de las colonias obtenidas después de la incubación utilizando técnicas de confirmación adecuada.

La selección de las colonias para la confirmación debería incluir tipos de colonias representativas.

### **11.3      MEDICIÓN DE LA INCERTIDUMBRE**

La estimación de la incertidumbre de la medición de determinaciones cualitativas está en proceso de investigación por parte de diversas instancias de normalización (nacional, regional e internacionales).

## **12.    MÉTODOS DE CONFIRMACIÓN**

### **12.1    GENERALIDADES**

Utilice únicamente cultivos puros para la confirmación bioquímica y serológica.

Los ensayos de confirmación de referencia se describen en las normas específicas. Como alternativa a los ensayos bioquímicos descritos en tales normas, los métodos de confirmación que se indican en esta sección (baterias bioquímicas, sondas de ácidos nucleicos) se pueden utilizar en las condiciones descritas aquí, a menos que se especifique algo diferente en las normas correspondientes.

### **12.2    PREPARACIÓN DE UN CULTIVO PURO**

Inicie la preparación de un cultivo puro mediante la selección de una sola colonia sobre o en un medio de agar. Después inocule la colonia seleccionada sobre un medio de agar no selectivo. Después de la incubación, seleccione una colonia bien aislada para los ensayos posteriores de confirmación. Repita la operación si es necesario.

Si es posible, los ensayos de confirmación se deberían realizar utilizando células provenientes de una sola colonia. Si el material celular no es suficiente en una colonia, es recomendable realizar un subcultivo en un medio líquido o sobre un medio de agar inclinado después de lo cual el subcultivo se puede utilizar para los ensayos

### **12.3    TINCIÓN DE GRAM (TÉCNICA DE HUCKER MODIFICADA)**

#### **12.3.1    Generalidades**

Este método de tinción de células bacterianas permite la descripción de la morfología de la bacteria y la clasificación en dos grupos dependiendo de si retienen o no la tintura violeta cristal (Gram+) en las condiciones de ensayo. Esta división es el producto principal de las diferencias en la estructura de las paredes celulares de los dos grupos y se correlaciona con otras diferencias importantes entre los dos grupos.

Una alternativa satisfactoria a la tinción de Gram es la utilización de una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 3 %. Luego se agita una asada lleno con el crecimiento bacteriano en dos gotas de la solución de KOH. Las bacterias Gram negativas harán que la solución se torne muy viscosa y mucosa en un lapso de 30 s, que se desprende como un hilo del asa cuando éste se levanta.

Existen varias formas para realizar la tinción de Gram, pero todas ellas siguen la secuencia que se presenta a continuación.

#### **12.3.2    Soluciones**

##### **12.3.2.1    Generalidades**

Se pueden utilizar soluciones disponibles en el comercio.

En este caso, siga las recomendaciones del fabricante.

**12.3.2.2 Solución de cristal violeta****12.3.2.2.1 Composición**

Cristal violeta	2,0 g
Etanol (95 %)	20 ml
Oxalato de amonio (C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	0,8 g
Agua	80 ml

**12.3.2.2.2 Preparación**

Disuelva el cristal violeta en el etanol, y el oxalato de amonio en el agua destilada. Mezcle las dos soluciones y permita que esta mezcla esté en reposo por 24 h antes del uso.

**12.3.2.3 Solución de yodo****12.3.2.3.1 Composición**

Yodo	1,0 g
Yoduro de potasio (KI)	2,0 g
Agua	100 ml

**12.3.2.3.2 Preparación**

Disuelva el yoduro de potasio en 10 ml de agua y adicione el yodo en fracciones. Después de la disolución, complete los 100 ml en un matraz volumétrico.

**12.3.2.4 Solución de safranina****12.3.2.4.1 Composición**

Safranina	0,25 g
Etanol (95 %)	10 ml
Agua	100 ml

**12.3.2.4.2 Preparación**

Disuelva la safranina en el etanol, luego mezcle con agua destilada.

**12.3.3 Técnica de tinción**

Después de la fijación con llama de una película bacteriana sobre un portaobjetos de microscopio, preparada a partir de un cultivo de 18 h a 24 h o cuando el caldo de cultivo está turbio, cubra la película con el cristal violeta. Permita que ocurra la reacción durante 1 min.

Enjuague ligeramente con agua el portaobjetos inclinado durante pocos segundos.

Cubra el portaobjetos con la solución de yodo. Permita que ocurra la reacción durante 1 min.

Enjuague ligeramente con agua el portaobjetos inclinado durante pocos segundos.

Vierta de manera suave y continua una película de etanol (95 %) sobre el portaobjetos inclinado durante un período no mayor a 30 s hasta que ya no se observe ninguna coloración violeta.

Enjuague ligeramente con agua el portaobjetos inclinado con el fin de eliminar el etanol. Cubra el portaobjetos con la solución de safranina durante 10 s. Enjuague ligeramente con agua el portaobjetos inclinado.

Seque el portaobjetos.

#### **12.3.4 Interpretación**

Examine el portaobjetos bajo el objetivo de inmersión en aceite de alta potencia de un microscopio. Aquellas células bacterianas que aparecen azules o violetas se denominan Gram positivas (Gram +); aquellas con color rosa oscuro a rojo se denominan Gram negativas (Gram -).

Para un cultivo puro de algunos tipos de bacterias, se pueden obtener células tanto Gram positivas como Gram negativas en el mismo campo del microscopio.

NOTA Las células densamente empaquetadas pueden suministrar una respuesta no característica.

### **12.4 USO DE BATERÍAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN**

Las baterías bioquímicas disponibles se pueden utilizar para la identificación de colonias aisladas.

Verifique que las galerías sean idóneas según estudios de evaluación publicados en la literatura científica internacional, de preferencia aquella relacionada con microbiología de alimentos<sup>4)</sup>. Esta verificación es especialmente importante si el fabricante no tiene datos de validación sobre tales baterías.

Es recomendable que el laboratorio obtenga un certificado de control para cada lote, con una indicación de las cepas de ensayo.

El fabricante también debe especificar las cepas de control que el laboratorio puede utilizar para verificar la preservación del desempeño de las baterías.

Las baterías deben incluir como mínimo los ensayos bioquímicos descritos en las normas específicas o se deben complementar con otros ensayos.

### **12.5 USO DE SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN**

Se pueden utilizar sondas de ácidos nucleicos disponibles actualmente para la identificación de colonias aisladas.

No obstante, verifique que las sondas nucleicas utilizadas para la confirmación sean las adecuadas según estudios de evaluación publicados en la literatura científica internacional, de preferencia aquella relacionada con microbiología de alimentos (véase por ejemplo la

---

<sup>4)</sup> Las solicitudes de información se deberían dirigir al centro de referencia nacional, regional o internacional indicado para cada microorganismo.

referencia [23]). Esta verificación es especialmente importante si el fabricante no tiene datos de validación sobre tales sondas.

Se recomienda que el laboratorio obtenga un certificado de control para cada lote, con una indicación de las cepas de ensayo.

El fabricante también debe especificar las cepas de control que el laboratorio puede usar para verificar el mantenimiento del desempeño de las sondas.

## **12.6 MÉTODOS SEROLÓGICOS**

### **12.6.1 Generalidades**

Cuando es necesaria la confirmación serológica, realícela después de la identificación bioquímica de las colonias aisladas.

### **12.6.2 Ensayos de aglutinación en portaobjetos**

Las reacciones antígeno-anticuerpo hacen que las células bacterianas se aglutinen y formen masas floculantes o gránulos densos. En el caso de las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, la reacción entre el antígeno "H" (es decir flagelar) y su antisuero homólogo produce aglutinación floculenta, mientras que la reacción que involucra al antígeno "O" (es decir somático) produce una aglutinación granular más densa.

Antes de la aglutinación con antisueros, se recomienda realizar un ensayo para determinar si las células bacterianas se aglutinan en solución de cloruro de sodio (3 % por masa). Si las células bacterianas se aglutinan, la cepa es autoaglutinable y no se debería aglutinar con antisueros.

Los antisueros disponibles comercialmente son de dos tipos: antisuero polivalente que reacciona con microorganismos de un género particular o con grupos de serotipos y que son adecuados para tamizado preliminar, y anticuerpos monoclonales específicos cuyo uso permite la identificación de un serotipo particular.

Es recomendable que el laboratorio obtenga un certificado de control para cada lote de antisueros, junto con una indicación de las cepas de ensayo.

Verifique que los ensayos de aglutinación en portaobjetos sean adecuados según estudios de evaluación publicados en la literatura científica internacional, de preferencia aquella relacionada con microbiología de alimentos<sup>5)</sup>.

Al utilizar los reactivos, es recomendable utilizar controles positivos y negativos adecuados.

### **12.6.3 Ensayo de aglutinación de látex**

Existe en el comercio un método más rápido que utiliza partículas de látex recubiertas con anticuerpos específicos de grupo (por ejemplo *Escherichia coli* O157, consulte la norma específica en la NTC 4899, o *Staphylococcus aureus* en la NTC 4779). El antígeno en el extracto se somete a ensayo frente a un rango de reactivos de látex.

---

<sup>5)</sup> Las solicitudes de información se deberían dirigir al centro de referencia nacional, regional o internacional indicado para cada microorganismo.

Verifique que los ensayos de aglutinación del látex sean adecuados según estudios de evaluación publicados en la literatura científica internacional, de preferencia aquella relacionada con microbiología de alimentos<sup>5)</sup>

Es recomendable que el laboratorio obtenga un certificado de control para cada lote, con una indicación de las cepas de ensayo.

Al utilizar los reactivos, es recomendable utilizar controles positivos y negativos adecuados.

### **13.    INFORME DE ENSAYO**

El informe de ensayo debe especificar el método utilizado, la temperatura de incubación, si es necesario, y los resultados obtenidos. También debe mencionar todos los detalles operativos no especificados en esta norma así como aquellos que se consideran opcionales, junto con los detalles de todo incidente que pueda haber tenido influencia en los resultados.

Indique también en el informe de ensayo si se deben realizar ensayos adicionales por parte de un laboratorio de referencia o, si tales ensayos se han llevado a cabo, cuáles fueron los resultados.

El informe de ensayo debería incluir toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra. También es conveniente incluir toda la información necesaria para la interpretación de los resultados de ensayo.

Si es necesario, en el informe de ensayo se debería incluir la medición de la incertidumbre determinada según la norma ISO/TS 19036.

### **14.    VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**

#### **14.1    VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE REFERENCIA**

La validación de los métodos de referencia está en proceso de investigación por parte de instancias de normalización (nacional, regional e internacional).

#### **14.2    VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ALTERNATIVOS**

Consulte la norma NTC 5014 con respecto al protocolo técnico para la validación de los métodos alternativos con respecto a los métodos de referencia.

#### **14.3    VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS INTERNOS**

La validación de los métodos internos está en proceso de investigación por parte de instancias de normalización (nacional, regional e internacional).

---

<sup>5)</sup> Las solicitudes de información se deberían dirigir al centro de referencia nacional, regional o internacional indicado para cada microorganismo.

## **15.    ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS/CONTROL DE CALIDAD DEL DESEMPEÑO**

### **15.1    CONTROL INTERNO DE LA CALIDAD**

**15.1.1** El control interno de la calidad consta de todos los procedimientos que se llevan a cabo en un laboratorio para la evaluación continua de su trabajo. El objetivo principal es garantizar la consistencia de los resultados diariamente y su conformidad con criterios bien definidos.

**15.1.2** Es necesario un programa de verificaciones periódicas para demostrar que la variabilidad (entre analistas, entre equipos o entre materiales) está bajo control. Es necesario cubrir todos los ensayos incluidos en el alcance de la actividad del laboratorio.

El programa puede involucrar:

- el uso de muestras adicionadas, con niveles variables de contaminación, incluyendo la flora objeto y de fondo (background),
- el uso de muestras adicionadas/contaminadas de manera natural provenientes de un rango de matrices,
- el uso de materiales de referencia (incluyendo interlaboratorios);
- ensayos replicados;
- evaluación replicada de los resultados de ensayo.

El intervalo entre estas verificaciones está influenciado por la naturaleza de los ensayos realizados por el laboratorio y la frecuencia de ejecución de tales ensayos.

Se recomienda que, siempre que sea posible, los ensayos incorporen controles para monitorear el desempeño.

**15.1.3** En casos especiales, el laboratorio puede realizar un ensayo particular. Se reconoce que, en dichos casos, un programa continuo de control de calidad interna puede no ser adecuado una forma para demostrar el desempeño satisfactorio es ejecutar en paléelo con el ensayo.

### **15.2    CEPAS DE REFERENCIA**

Consulte la guía GTC 78 con respecto al mantenimiento de las cepas de referencia.

### **15.3    EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD ( INTERLABORATORIOS)**

Es recomendable que los laboratorios participen con regularidad en esquemas de interlaboratorios que sean pertinentes para el alcance de su actividad. Se debería dar preferencia a los esquemas de ensayo de suficiencia que utilizan matrices adecuadas.

Es recomendable que los laboratorios utilicen evaluación externa de la calidad no solamente para evaluar el sesgo del laboratorio sino también para verificar la validez de todo su sistema de calidad.

ANEXO A  
(Informativo)

PROPIEDADES DE ALGUNOS DESINFECTANTES

Tabla A.1. Propiedades de algunos desinfectantes

Desinfectantes	Activo contra							Inactivado por					Toxicidad		
	Hongos	Bacterias		Mico bacterias	Esporas	Virus Lípidos	Virus no lípidos	Proteínas	Materiales naturales	Materiales sintéticos	Agua dura	Detergente	Piel	Ojos	Pulmones
		Gram positivas	Gram negativas												
	+	+++	+++	++	++	+	+	+++	+	+	+	C	+	+	+
	-	+++	+++	+++	-	+	V	+	+	+	+	-		+	
	+++	+++	+++	+++	+++ <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	+++	+++	+++	+++	+++ <sup>b</sup>	+	+	NA	+	+	+	NA	+++	+++	+++
	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+	+	+	A	+	+	-

+++ Bueno;  
 ++ Justo;  
 + Ligero;  
 - Ninguna;  
 V Depende del virus;  
 C Cationico;  
 A Aniónico;  
 NA no aplica.  
<sup>a</sup> por encima de 40 °C  
<sup>b</sup> por encima de 20 °C

**ANEXO B**  
(Normativo)

**DETERMINACIÓN DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)**

**Tabla B.1. Valores de NMP por cada porción de ensayo y límites de confianza al 95 % de una serie de 10 tubos, calculados según la referencia [29]**

Número de tubos positivos	Serie de 10 tubos			
	NMP	Incertidumbre estándar del NMP $\log_{10}$	Límites al 96 %	
			Inferior	Superior
1	0,11	0,435	0,02	0,75
2	0,22	0,308	0,06	0,89
3	0,36	0,252	0,11	1,11
4	0,51	0,220	0,19	1,38
5	0,69	0,198	0,28	1,69
6	0,92	0,184	0,40	2,10
7	1,20	0,174	0,55	2,64
8	1,61	0,171	0,75	3,48
9	2,30	0,179	1,03	5,16

**Tabla B.2. Valores de NMP por cada porción de ensayo y límites de confianza al 95 % de una serie de 15 tubos, calculados según la referencia [29]**

Número de tubos positivos	Serie de 15 tubos			
	NMP	Incertidumbre estándar del NMP $\log_{10}$	Límites al 95 %	
			Inferior	Superior
1	0,07	0,434	0,01	0,49
2	0,14	0,307	0,04	0,57
3	0,22	0,251	0,07	0,69
4	0,31	0,218	0,12	0,83
5	0,41	0,196	0,17	0,98
6	0,51	0,179	0,23	1,15
7	0,63	0,167	0,30	1,33
8	0,76	0,157	0,37	1,55
9	0,92	0,150	0,47	1,80
10	1,10	0,144	0,57	2,11
11	1,32	0,141	0,70	2,49
12	1,61	0,139	0,86	3,02
13	2,01	0,142	1,06	3,82
14	2,71	0,155	1,35	5,45

**Tabla B.3. Valores de NMP por cada porción de ensayo y límites de confianza al 95 % de una serie de 20 tubos, calculados según la referencia [29]**

Número de tubos positivos	Serie de 20 tubos			
	NMP	Incertidumbre estándar del NMP $\log_{10}$	Límites al 95 %	
			Inferior	Superior
1	0,05	0,434	0,01	0,36
2	0,11	0,307	0,03	0,42
3	0,16	0,251	0,05	0,50
4	0,22	0,218	0,08	0,60
5	0,29	0,195	0,12	0,69

Continúa . . .

Tabla B.3. (Final)

Número de tubos positivos	Serie de 20 tubos			
	NMP	Incertidumbre estándar del NMP $\log_{10}$	Límites al 95 %	
			Inferior	Superior
6	0,36	0,178	0,16	0,80
7	0,43	0,165	0,20	0,91
8	0,51	0,155	0,25	1,03
9	0,59	0,147	0,31	1,16
10	0,69	0,140	0,37	1,30
11	0,80	0,134	0,44	1,46
12	0,92	0,130	0,51	1,65
13	1,05	0,126	0,59	1,85
14	1,20	0,123	0,69	2,10
15	1,39	0,121	0,80	2,40
16	1,61	0,121	0,93	2,77
17	1,90	0,122	1,09	3,29
18	2,30	0,127	1,30	4,08
19	3,00	0,141	1,58	5,67

Tabla B.4. Valores de NMP por cada porción de ensayo y límites de confianza al 95 % de una serie de 25 tubos, calculados según la referencia [29]

Número de tubos positivos	Serie de 25 tubos			
	NMP	Incertidumbre estándar del NMP $\log_{10}$	Límites al 96 %	
			Inferior	Superior
1	0,04	0,434	0,01	0,29
2	0,08	0,307	0,02	0,33
3	0,13	0,251	0,04	0,40
4	0,17	0,217	0,07	0,47
5	0,22	0,195	0,09	0,54
6	0,27	0,178	0,12	0,61
7	0,33	0,165	0,16	0,69
8	0,39	0,154	0,19	0,77
9	0,45	0,146	0,23	0,86
10	0,51	0,139	0,27	0,96
11	0,58	0,133	0,32	1,06
12	0,65	0,128	0,37	1,16
13	0,73	0,123	0,42	1,28
14	0,82	0,119	0,48	1,41
15	0,92	0,116	0,54	1,55
16	1,02	0,113	0,61	1,70
17	1,14	0,111	0,69	1,88
18	1,27	0,109	0,78	2,09
19	1,43	0,108	0,88	2,33
20	1,61	0,108	0,99	2,62
21	1,83	0,109	1,12	2,99
22	2,12	0,111	1,29	3,50
23	2,53	0,117	1,49	4,28
24	3,22	0,123	1,77	5,85

**NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 4092 (Primera actualización)**

**Tabla B.5. Índices de NMP y límites de confianza (95 %) cuando se utilizan tres porciones de ensayo de 1 g (ml), tres de 0,1 g (ml) y tres de 0,01 g (ml)**

Número de resultados positivos			Índice NMP <sup>a</sup>	Categoría <sup>b</sup>	Límites de confianza (95 %) <sup>a, c</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
0	0	0	< 0.30		0,00	0,94
0	0	1	0.30	3	0,01	0,95
0	1	0	0.30	2	0,01	1
0	1	1	0.61	0	0,12	1,7
0	2	0	0.62	3	0,12	1,7
0	3	0	0.94	0	0,35	3,5
1	0	0	0.36	1	0,02	1,7
1	0	1	0.72	2	0,12	1,7
1	0	2	1.1	0	0,4	3,5
1	1	0	0.74	1	0,13	2
1	1	1	1.1	3	0,4	3,5
1	2	0	1.1	2	0,4	3,5
1	2	1	1.5	3	0,5	3,8
1	3	0	1.6	3	0,5	3,8
2	0	0	0.92	1	0,15	3,5
2	0	1	1.4	2	0,4	3,5
2	0	2	2.0	0	0,5	3,8
2	1	0	1.5	1	0,4	3,8
2	1	1	2.0	2	0,5	3,8
2	1	2	2.7	0	0,9	9,4
2	2	0	2.1	1	0,5	4
2	2	1	2.8	3	0,9	9,4
2	2	2	3.5	0	0,9	9,4
2	3	0	2.9	3	0,9	9,4
2	3	1	3.6	0	0,9	9,4
3	0	0	2.3	1	0,5	9,4
3	0	1	3.8	1	0,9	10,4
3	0	2	6.4	3	1,6	18,1
3	1	0	4.3	1	0,9	18,1
3	1	1	7.5	1	1,7	19,9
3	1	2	12	3	3	36
3	1	3	16	0	3	38
3	2	0	9.3	1	1,8	36
3	2	1	15	1	3	38
3	2	2	21	2	3	40
3	2	3	29	3	9	99
3	3	0	24	1	4	99
3	3	1	46	1	9	198
3	3	2	110	1	20	400
3	3	3	> 110			

<sup>a</sup> Fuente: referencia [27].

<sup>b</sup> Véase la Tabla B.6.

<sup>c</sup> Los límites de confianza indicados en esta tabla tienen como objeto únicamente brindar una idea de la influencia de las variaciones estadísticas en los resultados. Siempre existirán otras fuentes de variación, que en muchas ocasiones son incluso más importantes.

**Tabla B.6. Explicación de las categorías de los resultados**

Categoría <sup>a</sup>	Definición
1	Cuando el número de bacterias en la muestra es igual al NMP encontrado, el resultado es uno de aquellos que tienen la máxima oportunidad de ser obtenido. Existe como máximo una oportunidad de sólo 5 % de obtener un resultado que es menos probable que aquel con la probabilidad mínima en esta categoría.
2	Cuando el número de bacterias en la muestra es igual al NMP encontrado, el resultado es uno de aquellos que tienen menor oportunidad de ser obtenido que incluso aquel con la probabilidad mínima en la categoría 1, pero existe como máximo una oportunidad de sólo 1 % de obtener un resultado que es menos probable que aquel con la probabilidad mínima en esta categoría.
3	Cuando el número de bacterias en la muestra es igual al NMP encontrado, el resultado es uno de aquellos que tienen menor oportunidad de ser obtenido que incluso aquel con la oportunidad mínima en la categoría 2, pero existe como máximo una oportunidad de sólo 0,1 % de obtener un resultado que es menos probable que aquel con la probabilidad mínima en esta categoría.
0	Cuando el número de bacterias en la muestra es igual al NMP encontrado, el resultado es uno de aquellos que tiene menor oportunidad de ser obtenido que incluso aquel con la probabilidad mínima en la categoría 3. Existe una oportunidad de sólo 0,1 % de obtener un resultado en esta categoría, sin que nada más esté incorrecto.
<sup>a</sup>	Antes de empezar el ensayo, es conveniente decidir cuál categoría será aceptable, es decir, únicamente 1, 1 y 2 o incluso 1, 2 y 3. Cuando la decisión que se va a tomar con base en el resultado es de gran importancia, únicamente se deberían aceptar los resultados con categoría 1, o máximo 1 y 2. Los resultados de categoría 0 se deberían considerar con gran desconfianza.

**NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 4092 (Primera actualización)**

**Tabla B.7. Valores de NMP por gramo de muestra y límites de confianza al 95 % (cuando se utilizan cinco porciones de ensayo de 1 g, cinco de 0,1 g y cinco de 0,01 g)**

Número de tubos que presentan reacción positiva			NMP (por gramo)	Límites de confianza al 95 %	
5 de 1 g	5 de 0,1 g	5 de 0,01 g		Inferior	Superior
0	0	0	< 0,2	< 0,1	0,7
0	1	0	0,2	< 0,1	0,7
0	2	0	0,4	< 0,1	1,1
1	0	0	0,2	< 0,1	0,7
1	0	1	0,4	< 0,1	1,1
1	1	0	0,4	< 0,1	1,1
1	1	1	0,6	< 0,1	1,5
2	0	0	0,5	< 0,1	1,3
2	0	1	0,7	0,1	1,7
2	1	0	0,7	0,1	1,7
2	1	1	0,9	0,2	2,1
2	2	0	0,9	0,2	2,1
2	3	0	1,2	0,3	2,8
3	0	0	0,8	0,1	1,9
3	0	1	1,1	0,2	2,5
3	1	0	1,1	0,2	2,5
3	1	1	1,4	0,4	3,4
3	2	0	1,4	0,4	3,4
3	2	1	1,7	0,5	4,6
3	3	0	1,7	0,5	4,6
4	0	0	1,3	0,3	3,1
4	0	1	1,7	0,5	4,6
4	1	0	1,7	0,5	4,6
4	1	1	2,1	0,7	6,3
4	1	2	2,6	0,9	7,8
4	2	0	2,2	0,7	6,7
4	2	1	2,6	0,9	7,8
4	3	0	2,7	0,9	8
4	3	1	3,3	1,1	9,3
4	4	0	3,4	1,2	9,3
5	0	0	2,3	0,7	7
5	0	1	3,1	1,1	8,9
5	0	2	4,3	1,5	11
5	1	0	3,3	1,1	9,3
5	1	1	4,6	1,6	12

Continúa . . .

**Tabla B.7. (Final)**

Número de tubos que presentan reacción positiva			NMP (por gramo)	Límites de confianza al 95 %	
5 de 1 g	5 de 0,1 g	5 de 0,01 g		Inferior	Superior
5	1	2	6,3	2,1	15
5	2	0	4,9	1,7	13
5	2	1	7	2,3	17
5	2	2	9,4	2,8	22
5	3	0	7,9	2,5	19
5	3	1	11	3,1	25
5	3	2	14	3,7	34
5	3	3	18	4,4	50
5	4	0	13	3,5	30
5	4	1	17	4,3	49
5	4	2	22	5,7	70
5	4	3	28	9	85
5	4	4	35	12	100
5	5	0	24	6,8	75
5	5	1	35	12	100
5	5	2	54	18	140
5	5	3	92	30	320
5	5	4	160	64	580
5	5	5	> 180	--	--

**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] Bell, C. Neaves, P. and Williams, A.P. *Food Microbiology and Laboratory Practice*, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK (2005).
- [2] ISO 9001, *Quality Management Systems - Requirements*.
- [3] *EA-Guidelines for the use of Computers and Computer Systems in Accredited Laboratories*, European Cooperation for Accreditation (1998).
- [4] *EA-4/10, Accreditation for Microbiological Laboratories*, European Cooperation for Accreditation (2002).
- [5] *Food Microbiology Program Requirements, Based Upon the FLAWG Document United States Accreditation Criteria for Laboratories Performing Food Microbiology Testing*, American Association for Laboratory Accreditation (A2LA).
- [6] AS 1766, *Australian Standard Methods for the Microbiological Examination of Food - Part 1: General Techniques and Procedures Update*.
- [7] Buttiaux, R., Beerens, H. and Tacquet, A. *Manuel de Techniques Bactériologiques*, Éditions Médicales Flammarion (4<sup>th</sup> edn.).
- [8] APHA *Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 2<sup>nd</sup> edition, Speck, M.L., editor. *Intersociety/Agency Committee on Microbiological Methods for Foods*, American Public Health Association, Washington, DC, 1984.
- [9] Cruickshank et al., *Medical Microbiology*, Vol.2, 12<sup>th</sup> edn., Churchill-Livingstone, Edinburgh (1975).
- [10] D'Aoust, J.Y. *Psychrotrophy and Foodborne Salmonella*. *Int. J. Food. Microbiol.* 1991, **13**, pp. 207-16.
- [11] D'Aoust, J.Y., Sewell, A.M. and McDonald, C. *Recovery of Salmonella spp. From Refrigerated pre-enrichment Cultures of Dry Food Composites*, *J. AOAC Int.* 1995, **78**, pp. 1322-7.
- [12] D'Aoust, J.Y., Sewell, A.M. and Greco, P. *Detection of Salmonella in dry Foods Using Refrigerated Pre-enrichment and Enrichment Broth Cultures: Summary of Collaborative Study*. *J. AOAC. Int.* 1993, **77**, pp. 1490-1.
- [13] D'Aoust, J.Y., Sewell, A.M. and Greco, P. *Detection of Salmonella in Dry Foods Using Refrigerated Pre-Enrichment and Enrichment Broth Cultures- Interlaboratory Study*. *J. AOAC. Int.* 1993, **76**, pp. 814-21.
- [14] Dalsgaard, A., Guardabassi, L., Lund, C., Bagge, L. and Gravesen, J. *Opbevaring af badevands-og drikkevandsrøper ved 0-5 °C i et døgn medfører en signifikant reduktion i antal Escherichia coli og kimalt*, *Dansk. Vet.* 2002 **17**, pp. 1-9.

- [15] Harrewijin, G.A., and Hartog, B.J. *Guidelines to Perform Microbiological Analyses of Food and Food Products* ("Good Laboratory Practice"), De Ware(n)-Chemicus 1979, **9**, pp. 1-11.
- [16] Muir, G.D., ed. *Hazards in the Chemical Laboratory*, Royal Institute of Chemistry, London (1971).
- [17] *Laboratory Biosafety Manual*, WHO, Geneva, 1993.
- [18] Lightfoot, N.F., Maier, E.A. (eds). *Microbiological Analysis of Food and Water - Guidelines for Quality Assurance*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands (1998).
- [19] Harrigan, W.F. and McCance, M.E. *Laboratory Methods in food and dairy microbiology*, Academic Press (1976).
- [20] *Laboratory safety at the Centers for Disease Control* (CDC), NHEW Publication No. CDC 79-8118, Atlanta, 1979.
- [21] *Laboratory Safety at the Centers for Disease Control*, US Dept of Health, Education and Welfare (Public Health Service), Atlanta, 1979.
- [22] Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costillow, R.N., Nester, E.W., Krieg, N.R. and Phillips, G.B. eds. *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC 20006 (1981).
- [23] Gnanou Besse, N., Audinet, N., Beaufort, A., Colin, P., Cornu, M. and Lombard, B. *A Contribution to the Improvement of Listeria Monocytogens Enumeration in Cold-smoked Salmon*. Int. J. Food Microbiol. 2004, **91**, pp. 119-27.
- [24] *Microbiological Testing Laboratory Accommodation Guidelines*, national Association of Testing Authorities, Australia.
- [25] *Microorganisms in Foods - 1: Their Significance And Methods of Enumeration*, ICMSF, University of Toronto Press (1968 update).
- [26] Shapton, D.A., Board, R.G. and Hauster, W.J. eds. *Safety in Microbiology*, Society for Applied Bacteriology Technical Series No. 1 and No. 6, Academic press (1972).
- [27] De Man, J.C. *MPN tables* (corrected), Eur. J. Appl. Biotechnol. 1983, **17**, pp. 301-5.
- [28] Cochran, W.G. *Estimation of Bacterial Densities by Means of the "Most Probable Number"*. Biometrics 1950, **6**, pp. 105-16.
- [29] Hurley, M.A. and Roscoe, M.E. *Automated Statistical Analysis of Microbial Enumeration by Dilution Series*, J. Appl. Bacteriol. 1993, **55**, pp. 159-64.
- [30] Niemela, S. *Statistical Evaluation of Results from Quantitative Microbiological Examinations*, Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) report No. 1, 2<sup>nd</sup> edition (1983).
- [31] Taylor, J. *The Estimation of Numbers of Bacteria by Tenfold Dilution Series*, J. Appl. Bacteriol. 1962, **25**, pp. 54-61.

- [32] Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9<sup>th</sup> edn., Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1994).
- [33] Krieg, N.R. and Holt, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Volume 1*, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA (1984).
- [34] Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology - Volume 2*, 2<sup>nd</sup> edition, Springer, New York, NY, 2001.
- [35] Kreger-van Rij, N.J.W. *The Yeasts - A Taxonomic Study*, 3<sup>rd</sup> edn., North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Netherlands.
- [36] Thomas, H.A. *Bacterial Densities from Fermentation Tube Tests*, J. Am. Water Works Assoc. 1942, 34, pp. 572-6.
- [37] ISO/IEC Guide 43-1, *Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons - Part 1: Development and Operation of Proficiency Testing Schemes*.
- [38] ISO 6888 (todas las partes), *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Horizontal Methods for the Enumeration of Coagulase-Positive Staphylococci (Staphylococcus Aureus and Other Species)*.
- [39] ISO 9998, *Water Quality. Practices for Evaluating and Controlling Microbiological Colony Count Media Used in Water Quality Tests*.
- [40] ISO/TR 13843, *Water Quality. Guidance on Validation of Microbiological Methods*.
- [41] ISO 14461-1, *Milk and Milk Products. Quality Control in Microbiological Laboratories. Part 1: Analyst Performance Assessment for Colony Counts*.
- [42] ISO 14461-2, *Milk and Milk Products. Quality Control in Microbiological Laboratories. Part 2: Determination of the Reliability of Colony Counts of Parallel Plates and Subsequent Dilution Steps*.
- [43] ISO 16654, *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Horizontal Method for the Detection of Escherichia coli O157*.
- [44] ISO/IEC 17025:2005, *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories*.
- [45] EN 12469, *Biotechnology - Performance Criteria for Microbiological Safety Cabinets*.
- [46] ISO 17604, *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Carcass Sampling for Microbiological Analysis*.
- [47] ISO 18593, *Microbiology of food and Animal Feeding Stuffs - Horizontal Methods for Sampling Techniques from Surfaces Using Contact Plates and Swab Methods*.
- [48] ISO Guide 99:1996, *International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology*.
- [49] ISO/TC 34/SC 9 N852, *Supporting Document on the Change from two to one Plate per Dilution for Colony-count Techniques (revision of ISO 7218)*, June 2007, Marie Cornu.

**DOCUMENTO DE REFERENCIA**

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. General Requirements and Guidance for Microbiological Examinations*. Geneva: ISO, 2007, 74 p (ISO 7218:2007 (E)).