

NORMA VENEZOLANA
TOMA, IDENTIFICACIÓN Y
PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

COVENIN
1126:2021
(2da. Revisión)

1 OBJETO

Esta norma establece el procedimiento a seguir para la toma, identificación y preparación aséptica de las muestras destinadas al análisis microbiológico a fin de asegurar la obtención de resultados valederos, confiables y reproducibles, con el propósito de proteger las muestras y al personal de laboratorio de posibles contaminaciones.

2 ALCANCE

Esta norma establece los procedimientos e instrucciones para realizar una toma de muestra aséptica, y una correcta identificación y preparación de muestras de alimentos líquidos, semilíquidos y sólidos.

3 REFERENCIAS NORMATIVAS

Las siguientes normas contienen disposiciones que, al ser citadas en este texto, constituyen requisitos de esta norma; las ediciones indicadas estaban en vigencia en el momento de esta publicación. Como toda norma está sujeta a revisión, se recomienda a aquellos que realicen acuerdos en base a ellas, que analicen la conveniencia de usar las ediciones más recientes de las normas citadas seguidamente:

- ISO 6887-1:2017(E).** Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
- INEN 1529-2:2013** Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis.
- COVENIN 3133-2001. (ISO IEC 2859-1,1999)** Procedimientos de muestreo para inspección por atributos. Parte 1: Esquemas de muestreo indexados por nivel de calidad de aceptación (NCA) para inspección lote por lote. (1ra. Revisión).
- INVIMA 2015** Manual de toma de muestras de alimentos y bebidas para entidades territoriales de salud.

4 TÉRMINOS Y DEFINICIONES

A los fines de este documento, se tienen los siguientes términos y definiciones:

4.1 Toma de muestras

Es el acto de seleccionar una determinada cantidad, o un número de recipientes o unidades de producción de un mismo lote de alimento, o de áreas de superficie que son o que entran en contacto con productos alimenticios.

4.2 Unidad de muestreo

Es la parte definible más pequeña de un lote (unidad de producción). Esto puede significar una lata, o un paquete, entre otras unidades de presentación. Cuando la producción es a granel y se envasa en

cajas, bidones, barriles, sacos, etc., entonces la unidad de muestreo es arbitraria y puede depender del utensilio o envase para tomar muestras. No se debe confundir esta unidad de muestreo con la porción de ensayo.

4.3 Porción de ensayo

Es la cantidad de material (tomada de la muestra de población) que se utiliza en el análisis, es la unidad analítica. En general, para los ensayos microbiológicos se utiliza una unidad de muestra de 10 o 25 g o ml o sus múltiplos.

4.4 Muestra

Conjunto formado por uno o más elementos (o parte de un producto) seleccionados por distintos medios en una población (o en una cantidad importante de producto). Tiene por objeto ofrecer información sobre una característica determinada de la población (o el producto) analizada, y servir de base para adoptar una decisión relativa a la población, el producto o el proceso que los haya generado.

4.5 Muestra representativa

Es aquella en la que se mantienen las características del lote del que procede. En concreto, es el caso de una muestra aleatoria simple, en la que todos los elementos o porciones del lote tienen la misma probabilidad de integrar la muestra.

4.6 Muestras de alimentos envasados

Son aquellas que provienen de establecimientos de fabricación, almacenamiento o expendios de alimentos contenidos en su envase original.

4.7 Muestras de alimentos preparados

Son aquellas muestras provenientes de servicios de alimentación, tales como, venta callejera, ambulatoria, mercados, alimentación para colectividades, restaurantes y servicios afines, alimentación diferida entre otros, que han sido sometidos o no a proceso de cocción, y que generalmente no cuentan con empaque propio, razón por la cual deben tomarse medidas para garantizar su integridad. Su recolección debe efectuarse evitando contaminarla por cualquier factor ambiental o humano.

4.8 Muestra de alimento homogénea

Es aquella de aspecto uniforme, en el que no se distinguen sus diferentes constituyentes.

4.9 Muestra de alimento heterogénea

Para los fines de esta norma, es aquella de aspecto heterogéneo en el que se distinguen sus diferentes constituyentes (combinación de diversos sólidos o de sólidos-líquidos), y dependiendo del propósito del ensayo, será necesario unir todos los constituyentes mediante un procesador o evaluar cada constituyente por separado.

4.10 Muestras de alimentos involucrados en intoxicaciones

Son aquellas que la Autoridad de salud ha relacionado a una intoxicación alimentaria. Suele ser frecuente que no se disponga de las cantidades necesarias de muestra, razón por la cual debe

recolectarse lo que esté disponible, extremando las precauciones de seguridad para evitar agregar contaminación a la muestra.

4.11 Muestras de línea

Son aquellas que se toman durante el proceso de producción a partir de tanques o tomamuestras

4.12 Alimento perecedero

Son aquellos que, por su tipo o condición, pueden deteriorarse.

4.13 Tasa de ataque

Es la valoración de incidencia que se registra durante un brote de una patología, relacionando el número de casos con la población expuesta al riesgo.

4.14 Suspensión inicial (dilución primaria)

Es la solución o emulsión obtenida después que la cantidad del producto en análisis (o de la porción de muestra preparada para el ensayo) ha sido pesada o medida y luego mezclada, utilizando un homogeneizador cuando es necesario y observando las precauciones apropiadas, con un volumen de diluyente igual a nueve veces la unidad de muestra, para que los microorganismos presentes en la unidad de muestra se distribuyan lo más uniformemente posible y se permita que las partículas grandes, si las hay, se sedimenten.

4.15 Otras diluciones decimales

Son las suspensiones, soluciones o emulsiones obtenidas mezclando un volumen específico de la dilución primaria con nueve veces el volumen del diluyente y repitiendo esta operación con cada dilución así preparada, hasta obtener una serie de diluciones decimales adecuada para la inoculación del medio de cultivo.

5 EQUIPOS

- a. Equipo para esterilización: autoclave, estufa y/o horno, mechero y un agente que permita flamear.
- b. Equipo para mantener muestras: refrigerador para almacenar muestras a $2-8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y congelador para almacenar muestras a temperaturas menores de $-20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- c. Equipo para descongelar muestras: baño de agua controlada termostáticamente, que opere $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y otro, a $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- d. Equipo para homogeneizar muestras: homogeneizadores mecánicos de paletas, trituradores, molinos con sus respectivos accesorios (jarras o vasos) o consumibles (bolsas de polietileno de paredes delgadas) debidamente esterilizados.
- e. Equipo para medir el pH: pH metro con compensación de temperatura y sensibilidad de 0,1 de unidad de pH o papel de pH con el rango adecuado.
- f. Equipo para pesar muestras: balanza con exactitud clase II y resolución mínima de 0,1 g.

g. Equipo para registrar la temperatura: termómetro adecuado para la temperatura que se desea evaluar (temperatura del ambiente y/o del producto).

6 MATERIALES

6.1 Materiales para la toma de muestras

a. Los materiales utilizados en la toma de muestras deben ser de acero inoxidable u otro material de resistencia adecuada, que no produzca cambios en la muestra que puedan afectar los resultados de los análisis subsiguientes. El instrumento debe ser lo suficientemente resistente para evitar deformaciones en el uso y que permita al operador moverlo en el producto, fácil y rápidamente. Si los utensilios o aparatos son soldados, la soldadura debe resistir temperaturas de 180°C. Todas las superficies deben ser lisas y libres de hendiduras, todas las esquinas deben ser redondeadas.

b. Los frascos para toma de muestras y sus cierres, deben ser de un material resistente a esterilizaciones repetidas, inerte, a prueba de derrames, de boca ancha, impermeable al agua y a las grasas tales como: envases de acero inoxidable, vidrio y algunos plásticos. Su capacidad debe ser adecuada para tomar la unidad de muestra deseada.

c. También se puede utilizar envases desechables de plástico o bolsas plásticas estériles con cierres apropiados. Estos envases deberían ser opacos y de capacidad y forma adecuadas para tomar la unidad de muestra deseada.

d. Para el transporte de muestras, el contenedor debe ser de un material que absorba los golpes, debe estar limpio, ser inerte, que ofrezca una protección adecuada contra la contaminación externa y evite el deterioro de la muestra durante el traslado.

e. Todo el material y utensilios usados en la toma de muestras para el análisis microbiológico deben estar limpios, secos, envueltos individualmente y esterilizados por uno de los siguientes métodos físicos:

- Vapor a presión de 15 libras/pulgada² (autoclave): 121°C durante 15 min, mínimo.
- Calor seco: (121-180) °C, en el punto más frío, durante el tiempo establecido en la Tabla 1 según la temperatura utilizada. Preferiblemente utilizar un horno con una eficiente circulación de aire para que haya la seguridad de que en todas las partes del horno se mantiene la temperatura fijada.

Tabla 1. Tiempo de esterilización sugerido según la temperatura disponible en el horno (tomada de Organización Panamericana de la Salud, 2008)

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
180	30
170	60
160	120
150	150
140	180
121	360

f. Si por alguna razón, es imposible la esterilización por estos dos métodos, utilizar los siguientes métodos alternos, que son secundarios, y se recomienda siempre que el material sea utilizado inmediatamente después de ser esterilizado y enfriado.

- *Agua hirviente*: ebullición en agua por 20 min, mínimo.
 - Inmersión en etanol al 96% (v/v) y flameado hasta que el etanol se consuma. Para materiales que resisten la llama directa.
 - Combustión: exponer a la llama de un mechero de Bunsen o de alcohol hasta la incandescencia y enfriar. Para materiales que resistan la incandescencia.
- g.** Para abrir envases: tijeras, cuchillos, abridores de latas y de botellas, martillos, alicates, destornilladores, herramienta especial para abrir cajas de cartón, bisturís, etc. Estos materiales deben estar únicamente destinados para la toma de muestras.
- h.** Para tomar muestras congeladas: sierras, hacha, cincel, sondas especiales que penetren en el producto y corten un trozo cilíndrico (punzones o caladores), taladros (de máximo 900 r/min), cucharas, pinzas; tenedores; torundas; plantillas de metal, con un cuadrado de superficie conocida recortado en el centro. Estos materiales deben estar únicamente destinados para la toma de muestras.
- i.** Para transporte de muestras congeladas o refrigeradas: recipiente para transportar muestras que mantenga la temperatura entre 0 y 5°C para muestras refrigeradas, y entre 0 y -20°C para muestras congeladas (cava o bolsas térmicas con hielo, geles de enfriamiento o hielo seco, refrigerador portátil).
- j.** Para identificar: etiquetas y marcador indeleble, rollo de cinta adhesiva, etiquetas, lapiceros, acta de toma de muestras.
- k.** Materiales varios: matraz, cilindros graduados, tubos, pipetas, jeringas, en condiciones estériles.
- l.** Gasa o algodón.

6.2 Materiales para la preparación de muestras

- a.** Los frascos para contener las muestras, deben ser de un material resistente a esterilizaciones repetidas, inerte, impermeable al agua y a las grasas (acero inoxidable, vidrio y algunos plásticos) y con capacidad para contener 90, 99, 225 y/o 450 ml de diluyente según la dilución a realizar. Los frascos para productos sólidos, semilíquidos o viscosos deben ser de boca ancha.
- b.** Envases desechables de plástico o bolsas plásticas con cierres apropiados estériles. Estos envases deberían ser opacos, con capacidad y forma adecuada para tomar la unidad de muestra deseada.
- c.** Cuchillos, espátulas, tenedores, pinzas, tijeras, cucharas y otros, debidamente esterilizados.
- d.** Pipetas graduadas estériles de un volumen adecuado para la dilución a realizar (por ejemplo 1, 2, 5, 10 o 11 ml.) y/o micropipetas de volumen adecuado con puntas estériles.
- e.** Cilindro graduado estéril de un volumen adecuado para la medición requerida (por ejemplo 10, 50, 100 o 500 ml).
- f.** Tubos de ensayo estériles de tamaño apropiado.
- g.** Envase para descarte de material: si no es desechable debe contener un agente desinfectante.

h. Gradillas y cestas para bolsas.

i. Etiquetas y marcadores.

j. Gasa o algodón.

7 REACTIVOS

a. Solución desinfectante como alcohol al 70% (etílico o isopropílico) o equivalente.

b. Diluentes (véase Anexo 1).

c. Solución tampón fosfato a pH 7,2 (Solución de Butterfield).

d. Agua peptonada al 0,1%.

e. Agua peptonada salina.

f. Agua peptonada tamponada.

g. Agua peptonada tamponada doble concentrada.

NOTA 1. Para el caso de algunos microorganismos o alimentos específicos donde sea necesario utilizar otros diluentes, se consultarán las normas respectivas.

NOTA 2. Se debe utilizar agua destilada o agua que cumpla con parámetros de calidad equivalentes.

NOTA 3. Se pueden utilizar marcas comerciales siguiendo estrictamente las instrucciones de preparación dadas por el fabricante.

8 MATERIAL A ENSAYAR

El material a ensayar consiste en una muestra representativa del alimento.

9 TOMA, TRANSPORTE E IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS

9.1 Toma de muestra

9.1.1 Generalidades

a. La toma de muestras debe ser realizada por un personal técnico adecuadamente entrenado, capacitado y autorizado para esta labor. El personal que lleve a cabo la toma de muestra debe contar con equipos de protección personal apropiados para la actividad a realizar, como, por ejemplo: bata, gorro y tapaboca. De ser necesario, el contacto directo de las manos con el producto deben usarse guantes estériles.

b. Cuando se requiera para análisis de control de calidad o para ser enviadas a los organismos oficiales competentes, tomar muestras contenidas en envases originales del producto, en forma de unidades completas, que presenten características óptimas de olor, color y presentación. A su vez cuando sea un producto preparado o elaborado, tomar en su condición final de producción. Ejemplo: Menú (desayuno, almuerzo, cena o refrigerio), tomar la muestra completa de lo producido en el establecimiento para el mismo.

c. Todas las unidades que conforman la muestra deben corresponder al mismo lote de producción, o ser una cantidad de producto elaborado, o preparado bajo las mismas condiciones.

d. Cuando se requiera para análisis de control de calidad o para ser enviados a los organismos oficiales competentes, los alimentos deben encontrarse dentro de su vida útil con (una) fecha de vencimiento que permita un tiempo amplio de comercialización, y en la cual se conozca el momento de elaboración para el caso de menús. Para algunos estudios, puede considerarse el análisis de productos fuera de su vida útil (estudios de estabilidad) o que no cuenten con esta información.

EJEMPLO: Frutas y legumbres.

e. En las muestras captadas con fines de vigilancia y control sanitario, el recipiente debe ser precintado a fin de evitar o detectar una apertura no autorizada.

f. En caso de muestras refrigeradas y/o congeladas, registrar tanto la temperatura del aire de la sala de almacenamiento o del vehículo como de la muestra. La toma de temperatura de la muestra debe realizarse en una porción distinta a la que será analizada microbiológicamente.

g. Tomar las muestras en condiciones asépticas, con rapidez, pero cuidadosamente, y de tal manera, que la muestra sea representativa del producto que se va a analizar.

9.1.2 Muestras de producto envasado

En la medida de lo posible tomar muestras representativas en su empaque original, cerrado herméticamente. Esto evita que la muestra se contamine al tomarla de su envase y permite el examen de las condiciones del empaque.

9.1.3 Muestras de alimentos heterogéneos

a. Tomar muestras en cantidades similares de cada uno de los componentes del alimento preparado. Si en alguna muestra que contenga 2 o más alimentos, alguno de ellos tiene mayor interés que los demás, tomarlos por separado y analizarlos individualmente.

b. Alimentos que combinan múltiples componentes se pueden tomar como una muestra simple.

9.1.4 Muestras de producto a granel (bidones, tambores o sacos)

a. Para los alimentos que se encuentran a granel, si el contenedor lo permite, tomar la muestra en forma aleatoria, de lo contrario tomar varias muestras de los extremos y centro del contenedor para obtener una muestra representativa. Cuando la toma de muestra se realice en un conducto de salida o una compuerta de una partida a granel, antes de obtener la muestra, se debe dejar pasar las primeras fracciones del producto para limpiar dicha salida con el flujo.

b. Si se han de realizar diferentes tipos de análisis (microbiológicos, químicos, físicos y sensoriales), tomar asépticamente primero y por separado las unidades de muestra destinadas al análisis microbiológico. No se debe utilizar agentes conservantes.

c. Desinfectar la parte externa del contenedor con alcohol al 70%, o alguna solución desinfectante equivalente, sin flamear. En caso de envases de papel, retirar la parte externa. Abrir el envase asépticamente con instrumentos estériles. Para cada envase utilizar un instrumento estéril.

d. Cuando sea posible, mezclar bien el producto hasta que esté homogeneizado y, cuando no es posible mezclar, tomar asépticamente alícuotas de diferentes sitios del contenedor hasta completar una cantidad no inferior a 200 g o ml.

e. La toma de muestras debe hacerse evitando su contaminación y se deben tomar todas las precauciones de asepsia, conservando en todo momento las condiciones adecuadas de temperatura y humedad.

f. El tamaño de la unidad de muestreo debe ser de 200 mililitros o gramos, mínimo. En muchos casos será el de la unidad de producción del lote, como latas herméticamente cerradas, conteniendo muchas veces la cantidad del alimento equivalente a la unidad de muestra, o envases muy pequeños de los que se necesitará tomar varios de ellos hasta completar los 200 gramos o mililitros.

9.1.5 Muestras congeladas de producto a granel

a. Seguir los pasos de acuerdo con 9.1.4.

b. Para la toma de muestra utilizar taladros u objetos punzo penetrantes que le permitan tomar una porción del producto sin que se descongele. Evitar procesos de descongelación y re-congelación de este tipo de muestras.

9.1.6 Muestras de línea (producto en proceso)

a. En caso de tener tomamuestras en tanques o puntos de línea, desinfectar el mismo con una solución de alcohol al 70% u otra solución desinfectante equivalente, dejar actuar entre 15 segundos y 10 min dependiendo de la solución utilizada. Purgar por 1 minuto. Tomar la muestra de manera aséptica en un envase o bolsa estéril.

b. Si no se cuenta con tomamuestras, se debe capturar la muestra utilizando implementos esterilizados según lo indicado en apartados anteriores para cada tipo de alimento.

9.1.7 Muestras relacionadas con enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)

9.1.7.1 Generalidades

a. En situaciones de brotes, recolectar todos los alimentos sospechosos. Si no quedan alimentos sobrantes, tratar de obtener muestras de los productos preparados de manera similar después del alimento sospechoso.

b. Recolectar ingredientes o productos crudos utilizados en la preparación del alimento sospechoso, si están disponibles. Todos estos alimentos deben mantenerse en condiciones adecuadas hasta que un análisis de los datos de la tasa de ataque y otros hechos puedan definir con mayor precisión el alimento sospechoso.

c. Los envases originales en los que se encontraron los alimentos también deben recogerse, etiquetarse y enviarse para su examen.

d. Utilizar utensilios estériles y depositar en recipientes o bolsas plásticas estériles.

e. Como mínimo tomar 200 g de muestra o en el caso que no los haya, tomar la cantidad existente.

9.1.7.2 Alimentos sólidos

a. Cortar o separar porciones de alimentos con un cuchillo esterilizado u otro implemento, de ser necesario. Recoger asépticamente y transferir a una bolsa de plástico o frasco de vidrio de boca ancha, esterilizado. En caso de alimentos preparados constituido por dos o más alimentos (ejemplo: almuerzo, cena, entre otros) tomar muestras en cantidades similares de cada uno de los componentes del alimento preparado.

b. Si en alguna muestra que contenga 2 o más alimentos, alguno de ellos tiene mayor interés que los demás, tomarlos por separado y analizarlos individualmente.

c. Alimentos que combinan múltiples componentes (por ejemplo, sándwich) se pueden tomar como una muestra simple.

9.1.7.3 Alimentos líquidos o semilíquidos

Mezclar o agitar para garantizar la homogeneidad. Recoger asépticamente y transferir a una bolsa de plástico o frasco de vidrio de boca ancha esterilizado.

9.1.7.4 Alimentos congelados

a. Si es posible, tomar pequeños volúmenes congelados, sin descongelar ni abrir.

b. Para piezas de mayor tamaño: perforar con taladro esterilizado de diámetro grande, desde la parte superior del envase, diagonalmente por el centro, hasta la parte inferior del lado opuesto o picar el material congelado con martillo y cincel esterilizado, recoger las astillas con un implemento esterilizado y transferir a un envase estéril.

9.1.7.5 Carnes o aves crudas

Con un implemento estéril o guante plástico estéril, cortar asépticamente una porción de carne o piel de partes diferentes de la carcasa o el corte de carne o remover una porción de carcasa y transferir a una bolsa plástica o frasco de vidrio esterilizado.

9.1.7.6 Alimentos deshidratados

- a. Alternativa 1: Insertar un tubo hueco esterilizado, desde la parte superior de un lado del envase, diagonalmente por el centro, hasta la parte inferior del lado opuesto. Sostener la parte superior y transferir a un envase esterilizado. Repetir del lado opuesto hasta recoger, por lo menos, 200 g.
- b. Alternativa 2: Recoger material con una cuchara, una espátula, un bajalengua o un implemento similar, siempre esterilizado. Transferir el material a un envase estéril.

9.2 Identificación

- a. Las unidades de muestra deben estar claramente etiquetadas e identificadas para permitir una buena trazabilidad. Esto se puede lograr escribiendo términos descriptivos, o numerando cada unidad de muestra directamente en el recipiente o en una etiqueta firmemente adherida con un marcador indeleble. No utilice un rotulador sobre plástico porque la tinta podría penetrar en el recipiente.
- b. La etiqueta debe colocarse entre la tapa y el cuerpo del frasco, en el nudo o cierre de la bolsa en forma tal que se evite que la muestra sea alterada o violada.
- c. La muestra debe estar acompañada de la siguiente información cuando aplique:
- Fecha de toma de la muestra.
 - Nombre y tipo de producto.
 - Marca comercial.
 - Fabricante y/o distribuidor.
 - Número del lote de fabricación.
 - Contenido neto del envase.
 - Ingredientes.
 - Fecha de fabricación y/o vencimiento.
 - Cualquier otra información que sirva de orientación para el análisis microbiológico.

EJEMPLO: Diagrama de flujo del proceso u otra.

9.3 Transporte

- a. La muestra de laboratorio debe conservarse de modo que se impida la alteración de la característica inspeccionada.
- b. La conservación y transporte de las muestras al laboratorio debe efectuarse de tal manera que se impida su ruptura, derrame, alteración o deterioro, evitando su exposición a la luz solar directa.

- c. El transporte de las muestras al laboratorio debe efectuarse en un recipiente limpio e inerte, que ofrezca una protección adecuada contra la contaminación externa y evite el deterioro de las muestras durante el transporte.
- d. El transporte de las muestras que requieren refrigeración o congelación debe realizarse en recipientes refrigerados (conservadores) u otro material aislante, y que tenga una capacidad suficiente.
- e. Cuando las muestras sean transportadas por servicio de mensajería o por otra persona distinta a la que tomó la muestra, precintar el recipiente conteniendo todas las muestras de forma que permita detectar toda apertura no autorizada.
- f. Las muestras de alimentos deben entregarse al laboratorio el mismo día de la toma, para ser analizadas en un tiempo total inferior a 48 horas, excepto aquellas que tengan dificultad en el transporte o por distancia. Si no es posible el traslado, mantener las muestras en condiciones de refrigeración.
- g. Transportar los alimentos perecederos refrigerados bajo condiciones de temperatura de 2 a 8 °C; y deben mantenerse a esa temperatura hasta el momento de realizar los ensayos.
- h. Para la refrigeración, es recomendable emplear recipientes con líquido refrigerante o hielo potable contenido en bolsas de plástico impermeables, para evitar que el agua de deshielo contamine a los alimentos muestreados. No utilizar hielo seco.
- i. Los alimentos congelados, la temperatura no debe ser mayor de 0 °C, para ello puede emplearse hielo seco.
- j. Durante el transporte las muestras deben mantenerse a temperatura de refrigeración, distribuida uniformemente en la base y en los lados para proporcionarles la temperatura entre 4 ± 2 °C, de manera que se garantice la cadena de frío hasta la entrega de la muestra al laboratorio.
- k. Los productos con presentación comercial (envasados) deben ser transportados en sus envases originales a temperatura ambiente, siempre y cuando esta no exceda de 45 °C.
- l. Para la conservación, durante el transporte de las muestras, no está permitido el empleo de sustancias químicas, salvo cuando el parámetro a evaluar así lo determine.

10 IDENTIFICACIÓN, CONSERVACIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO

10.1 Identificación de la muestra

Al llegar la muestra al laboratorio, debe anotarse la fecha de llegada y asignarse un código inequívoco para el análisis, a fin de proceder a su debida identificación tomando nota de los aspectos siguientes:

- a. Condiciones en que se recibió la muestra, tales como:
- Temperatura (en caso de que la muestra requiera refrigeración o congelación).
 - Aspecto externo del envase (si está roto, destapado, cierre no hermético, si presenta oxidación, abombamiento, abolladuras, etc.).

- Aspecto externo del producto, en caso de que este pueda ser observado.
- Cualquier otra característica que pudiera afectar el resultado del análisis.

10.2 Conservación de la muestra previa a su análisis

- a. Las muestras deben ser analizadas lo más pronto posible una vez recibidas en el laboratorio.
- b. Almacenamiento de las muestras. Las muestras deben almacenarse protegidas de cualquier contaminación, de luz solar directa o de otras fuentes de calor y a las temperaturas que se indican:
 - Productos congelados, a $-20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, se sugiere que no supere los siete días de almacenamiento para no afectar las formas celulares vegetativas de bacterias por la congelación prolongada.
 - Productos perecederos no congelados, entre 2 °C y 8 °C , por no más de 36 horas a menos que se especifique lo contrario.
 - Productos estables o no perecederos: enlatados, productos deshidratados, entre otros, a temperatura ambiente en lugares secos y frescos. Se sugiere analizar lo más pronto posible después de la toma de muestra, aunque el producto debería mantener sus características durante todo su período de vida útil.

10.3 Preparación de la muestra

10.3.1 Condiciones generales

- a. El sitio donde se realizará el análisis microbiológico debe reunir las condiciones de asepsia. Desinfectar el área de preparación de la muestra mediante algún agente adecuado tal como el alcohol al 70% o alguna solución desinfectante equivalente.
- b. El material y equipo a utilizar debe estar convenientemente preparado, identificado y listo para su uso.
- c. Limpiar el envase o el empaque meticulosamente con una solución desinfectante como alcohol al 70% o alguna solución desinfectante equivalente, debe darse una atención especial al área de abertura del empaque o envase. De presentar polvo u otras partículas adheridas a la superficie, se debe limpiar previamente con agua y jabón.
- d. Los envases de hojalata u otro material similar se pueden flamear para la desinfección. No se deben flamear aquellos envases o empaques que puedan dañarse y/o explotar.

NOTA. En caso de que se requieran condiciones de asepsia más estrictas (prueba del deterioro microbiológico) utilizar además otros desinfectantes, tales como el alcohol yodado (2 % de yodo) y compuestos derivados de amonio cuaternario. Utilizar cabinas especiales (flujo laminar). Si no se dispone de estas, utilizar áreas desinfectadas y protegidas de las corrientes de aire.

- e. Cuando se abra el recipiente con la muestra debe evitarse cualquier tipo de contaminación, cuidando de que no ocurra contacto del área de apertura con cualquier superficie contaminada.

NOTA. Si no se dispone de cabinas especiales, abrir primero los productos en los cuales se supone que haya menor carga microbiana (pasteurizados, precocidos) y por último los crudos o desecados. Esto es con la finalidad de prevenir la contaminación del área de trabajo y así evitar contaminaciones cruzadas.

f. Cuando se proceda a hacer el análisis se debe tomar nota del aspecto de la muestra: color, consistencia, textura. Debe evitarse la evaluación del sabor de la muestra.

10.3.2 Tratamiento de la muestra según su estado físico

a. Si se trata de alimentos líquidos o material que fluya libremente, envasados en recipientes pequeños, debe agitarse haciendo un ángulo de 45° con el brazo o por rotación del recipiente hasta que el contenido sea homogéneo, evitando la formación de burbujas. En el caso de que los recipientes sean grandes y de difícil manejo se deben tomar muestras representativas y trasvasarlas asépticamente a envases estériles más pequeños. La unidad analítica se debe tomar de una mezcla de todos los envases muestreados.

b. Si la muestra está congelada, se deja descongelar en su recipiente original (o en el cual se recibió en el laboratorio) siguiendo alguno de los siguientes protocolos:

- Por un periodo de 15 minutos a 45 °C en baño de agua (si no existe riesgo de que se contamine por contacto con el agua) mezclando continuamente.
- Por un período o hasta 24 horas entre 2 y 8 °C, homogeneizar agitando vigorosamente.
- Por un período máximo de 3 horas a temperatura entre 18-27 °C mezclando continuamente.
- Si la muestra congelada puede trabajarse fácilmente (ej. un helado) se procede sin descongelar.

c. Si el material es sólido, tomar porciones de diferentes sitios del producto para tener una muestra representativa. En caso de muestras secas, mezclar con cucharas esterilizadas u otros utensilios antes de extraer la unidad analítica de una muestra.

d. Cuando se tenga una muestra de difícil manejo, se puede colocar en un recipiente grande y estéril. La muestra se debe romper en pequeños trozos a través de métodos adecuados y bajo condiciones asépticas. De este recipiente, se debe tomar una nueva muestra, con el fin de transferirla a un recipiente estéril.

e. Si el contenido del envase es heterogéneo, preparar una mezcla homogénea de todo su contenido o se analizan porciones separadas del mismo dependiendo del propósito del ensayo.

NOTA. En caso de alimentos que presenten una cubierta natural (huevos, ostras, etc), u otras condiciones particulares la modificación en la preparación de la muestra se especificará en la norma respectiva.

10.3.3 Homogeneización y preparación de las diluciones de muestras que requieren enumeración de microorganismos

10.3.3.1 Muestras sólidas

a. Pesar 10, 11, 25 o 50 g \pm 0,1 de la muestra en una jarra, frasco apropiado o en bolsas de polietileno, estériles, previamente tarados. Se pueden tomar otras porciones según la necesidad del ensayo, mientras se mantenga la dilución 1/10 en relación al diluyente. Se recomienda tomar siempre que sea posible, la mayor cantidad de muestra a fin de obtener resultados más confiables.

b. Añadir 90, 99, 225 o 450 ml de diluyente respectivamente (solución tampón fosfato o agua peptonada al 0,1% a temperatura ambiente). Se pueden utilizar otras sustancias diluyentes si el método utilizado así lo indica. La muestra preparada según la forma antes descrita, corresponde a la primera dilución (10-1). Cuando la dilución primaria es muy viscosa o pegajosa, adicionar más diluyente, lo cual debe tomarse en cuenta para las operaciones subsecuentes o expresión de resultados.

c. Homogeneizar por no más de 2 minutos a una velocidad comprendida entre 8000-45000 rpm en un homogeneizador mecánico o a 230 rpm en un homogeneizador mecánico de paletas o peristáltico por 60 segundos. Debe cuidarse que la homogeneización no genere calor en la muestra. No deben transcurrir más de 30 min entre la preparación de la mezcla y la preparación de las diluciones o 45 min entre la preparación y la siembra de la muestra.

d. Esperar alrededor de 15 min para que las partículas grandes se sedimenten, y transferir la cantidad deseada tomando de las capas superiores de la suspensión, y si hay una capa de grasa, tomar de la parte acuosa.

e. El homogeneizador mecánico de paletas puede no ser adecuado para algunos productos (por ejemplo, aquellos con partículas agudas o constituyentes que no se dispersen fácilmente).

f. Si no se cuenta o no se puede utilizar un homogeneizador mecánico, se puede efectuar la mezcla agitando vigorosamente, bien sea por un movimiento del brazo en un ángulo de 45° o por rotación del recipiente en diferentes sentidos hasta lograr la homogeneidad de la misma.

NOTA. En el caso de alimentos cuya microbiota está limitada a la superficie (maní, nueces, almendras, pasas, aceitunas sin deshuesar u otros) pesar 50 g y añadir 50 ml del diluyente, agitar vigorosamente en un ángulo de 45°. Cada ml de la solución de enjuague será equivalente a 1 g de muestra. Dejar en reposo de 3 a 5 min y posteriormente agitar 5 veces en un arco de 30 cm para resuspender justo antes de realizar las diluciones o la siembra de la muestra.

10.3.3.2 Muestras líquidas

a. Si se espera baja carga microbiana, sembrar directamente la muestra tomando el volumen correspondiente a la metodología a aplicar.

b. Si se espera alta carga microbiana o si existe alguna interferencia de la matriz, medir con una pipeta graduada o pipeta automática 10 u 11 ml de la muestra, y transferir a un frasco de dilución que contenga 90 o 99 ml respectivamente de diluyente (tampón fosfato o agua peptonada 0,1% a temperatura ambiente). Siempre se debe mantener la proporción de 1 parte de muestra y 9 partes de diluyente independiente de la cantidad de muestra tomada. En el caso de muestras muy viscosas.

EJEMPLO: Chicha, jarabes, leche condensada, yogurt, crema de leche, pulpas de frutas, éstas deben pesarse. En el caso de muestras líquidas con elevada cantidad de gas (refrescos, malta, agua mineral gasificada) trasvasar a un recipiente estéril y agitar por rotación durante 15-30 minutos hasta que liberen el gas.

c. La muestra se agita, bien sea por un movimiento del brazo en un ángulo de 45 C° o por rotación del recipiente en diferentes sentidos hasta lograr la homogeneidad de la misma.

10.3.3.3 Muestras grasas (>20%)

a. Cuando se analicen alimentos con alto contenido de grasa o polvos que formen grumos, añadir al diluyente, agentes humectantes tales como el tergitol 7 aniónico (1% p/v) o polisorbato 80 (entre 0,1 y 1% p/v. Se sugiere calcular 0,1% por cada 10% de grasa) para facilitar la emulsificación.

EJEMPLO: Quesos, crema de leche, mantequilla, chorizo, albúmina.

b. También puede calentarse el diluyente a 45 °C para facilitar la disolución.

c. Proceder según lo establecido en 10.3.3.1 o 10.3.3.2.

10.3.3.4 Muestras de alimentos ácidos

a. En muestras con pH hasta 4,5 utilizar agua peptonada tamponada como diluyente.

b. En muestras con pH menor a 4,5 y hasta pH 3,5 utilizar agua peptonada tamponada doble concentrada.

c. Proceder según lo establecido en 10.3.3.1 o 10.3.3.2.

10.3.3.5 Muestras de baja humedad o productos deshidratados

a. Añadir primero el diluyente y luego la muestra para disminuir la posibilidad de choque osmótico.

b. Algunos alimentos (como productos de confitería) pueden requerir un período de reposo a temperatura ambiente hasta de alrededor de 30 min antes de proceder a la homogeneización mecánica.

c. Proceder según lo establecido en 10.3.3.1.

NOTA. La muestra preparada de acuerdo a 10.3.3.1 o 10.3.3.2, corresponde a la primera dilución (10-1).

10.3.3.6 Preparación de muestras compuestas

Si se requiere, y solo para análisis cualitativos, se pueden analizar varias muestras al mismo tiempo formando una muestra compuesta de acuerdo a las siguientes alternativas:

a) Se pueden tomar porciones equivalentes de cada muestra individual, homogeneizarlas y tomar de esta nueva muestra compuesta, la unidad analítica requerida.

b) Se puede dividir la cantidad requerida para la unidad analítica entre el número de muestras a evaluar y tomar porciones equivalentes de cada muestra individual, homogeneizarlas y continuar el análisis.

c) Se puede tomar la unidad analítica de cada muestra individual, mezclarlas y añadir la cantidad de diluyente requerida para mantener la dilución 1/10 de acuerdo con el tamaño de la nueva unidad analítica.

EJEMPLO: Para 4 muestras de 25 g se requerirán 900 ml de diluyente.

10.3.3.7 Preparación de diluciones decimales (ver Anexo 2)

A partir de la primera dilución obtenida en 10.3.3.1. o 10.3.3.2. se procede de inmediato a preparar las diluciones necesarias de la siguiente forma:

a) Medir 1, 10 u 11 ml de la dilución 10⁻¹ y transferir a un tubo o frasco que contenga 9, 10 u 11 ml de diluyente respectivamente para obtener la dilución 10⁻². Siempre se debe mantener la proporción de 1 parte de muestra y 9 partes de diluyente independiente de la cantidad de muestra tomada.

b) Agitar el tubo o frasco utilizado, bien sea por un movimiento de brazo en un ángulo de 45°, por rotación del recipiente en diferentes sentidos o en mezclador de vórtice (solo para tubos).

c) Si es necesario, repetir lo indicado en el literal a para la dilución 10⁻³ y siguientes diluciones, hasta obtener el número necesario de diluciones y alcanzar el número adecuado de microorganismos por ml o g. Utilizar pipetas diferentes para cada dilución.

NOTA. La inoculación del medio se debe llevar a cabo dentro de los 20 minutos siguientes a la preparación de las diluciones.

BIBLIOGRAFÍA

American Public Health Association. 2001. Compendium of Methods for Microbiological Examination of foods. fourth edition. Frances Pouch Downes and Kieih Ito. Editor Washington D.C.

American Public Health Association. 1984. Compendium of Methods for Microbiological Examination of foods. 2nd edition. M. Speck. Editor Washington D.C.

Codex CAC/GL 50-2004. Directrices generales sobre muestreo.

Codex/FAO. 1998. Código internacional recomendado revisado de prácticas-principios generales de higiene de los alimentos. Roma.

Colimon, Kahl-Martin. 2010. Fundamentos de Epidemiología. 3a Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB. Medellín, Colombia.

Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos. 1980. Microorganisms in Foods. 1. Their significance and methods of enumeration. The International Commission on Microbiological Specification of Foods. Editorial University of Toronto Press. Toronto. Canada.

Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos. ICMSF. 1999. Microorganismos de los alimentos. Volumen II. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos. Principios y aplicaciones específicas. 2^a Edición. Editorial Acribia, S.A. pp. 260.

Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos. 1980. Microorganisms in Foods 7. Chapter 12. Sampling, Sample Handling, and Sample Analysis. The International Commission on Microbiological Specification of Foods. Editorial University of Toronto Press. Toronto. Canada.

Directiva Sanitaria N° 032 - MINSA/DIGESA – V.01 Procedimiento para la Recepción de Muestras de Alimentos y Bebidas de Consumo Humano en el Laboratorio de Control Ambiental de la Dirección General de Salud Ambiental del Ministerio de Salud.

Food and Drug Administration. 2018. Bacteriological Analytical Manual. Food and Drug Administration. Bureau of Foods Division of Microbiology. 6tn. Edition. AOAC. Box 50. Benjamin Franklin Station. Washington. DC 20044. U.S.A.

García R. Carmen E. (1990). Análisis Microbiológico de Alimentos. Editorial Ciencia 3 Distribución S.A. pp. 189.

ISO 6887-1:2017(E). Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 1529-2:2013 Primera revisión CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. TOMA, ENVÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Organización Panamericana de la Salud. 2008. Manual de esterilización para centros de salud. Washington DC. 20044. U.S.A

Salud pública de Ontario, Canadá. (2019). Food Sample Analysis, Sample preparation and Collection [visto 2020, agosto 14] 14/08/2020 Disponible en: <<https://www.publichealthontario.ca/en/laboratory-services/public-health-inspectors-guide/phi-food#?tab=1>>

PROYECTO DE NORMA

ANEXO 1.
**FÓRMULA Y PREPARACIÓN DE LOS DILUENTES REQUERIDOS PARA LA
PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

10.4 Solución tampón fosfato a pH 7,2 (Solución de Butterfield)

10.4.1 Fórmula

Fosfato diácido de potasio (KH ₂ PO ₄)	34 g
Agua destilada	1000 ml

10.4.2 Preparación

Disolver el fosfato diácido de potasio en 500 ml de agua destilada, ajustar a pH 7,2 con aproximadamente 175 ml de NaOH 1N. Diluir a 1 litro, esterilizar a 121 °C por 15 minutos y almacenar bajo refrigeración.

10.4.3 Solución de trabajo

Diluir 1,25 ml de solución madre hasta 1 litro con agua destilada. Repartir la solución en frascos o tubos de dilución adecuados. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos. También se puede preparar la solución y dispensar luego asépticamente en envases estériles.

10.5 Agua peptonada al 0,1 %

10.5.1 Fórmula

Peptona	1,0 g
Agua destilada	1000 ml

10.5.2 Preparación

Disolver la peptona en el agua destilada y ajustar el pH del medio de manera que después de la esterilización sea de 7,0 ± 0,1. Distribuir en porciones adecuadas en frascos o tubos de dilución. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos. También se puede preparar la solución y dispensar luego asépticamente en envases estériles.

10.5.3 Agua peptonada salina

10.5.3.1 Fórmula

Peptona	1 g
Cloruro de sodio	8,5 g
Agua destilada	1000 ml

10.5.3.2 Preparación

Disolver la peptona y el cloruro de sodio en el agua destilada y ajustar el pH del medio de manera que después de la esterilización sea de 7,0 ± 0,1. Distribuir en porciones adecuadas en frascos o tubos de

dilución. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos. También se puede preparar la solución y dispensar luego asépticamente en envases estériles.

10.6 Agua peptonada tamponada

10.6.1 Fórmula

Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Disodio hidrógeno fosfato dodecahidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH_2PO_4)	1,5 g
Agua destilada	1000 ml

10.6.2 Preparación

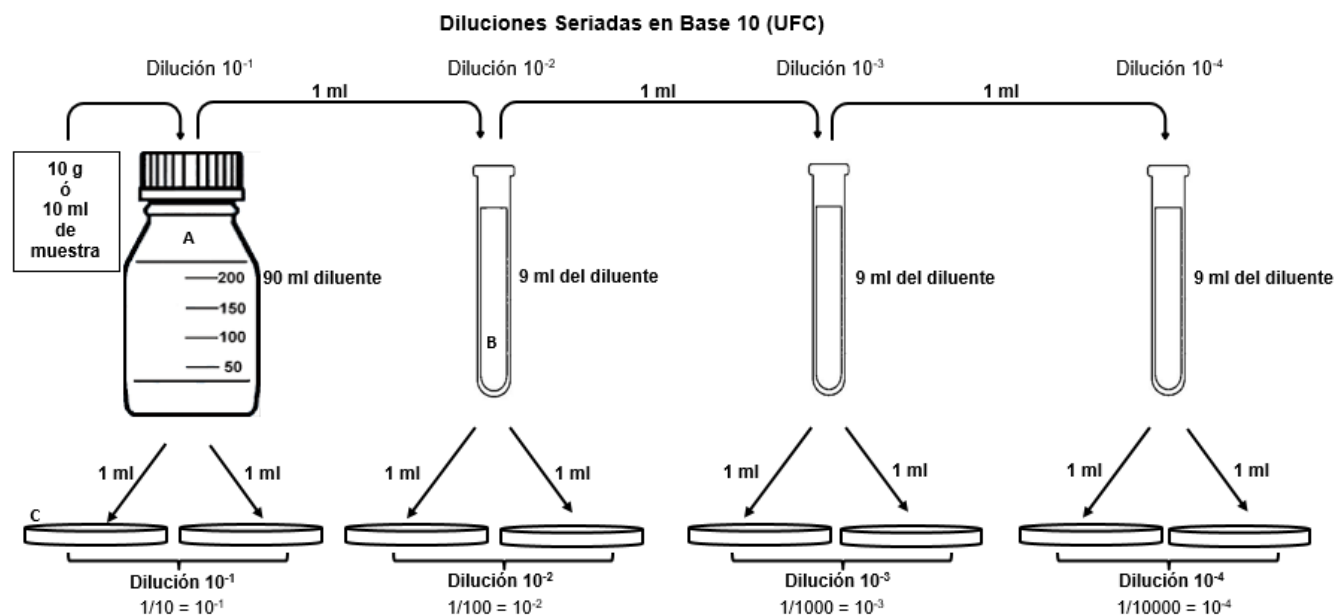
Disolver los ingredientes en el agua destilada y ajustar el pH del medio de manera que después de la esterilización sea de $7,0 \pm 0,1$. Distribuir en porciones adecuadas en frascos o tubos de dilución. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos. También se puede preparar la solución y dispensar luego asépticamente en envases estériles.

10.7 Agua peptonada tamponada doble concentrada

10.7.1 Preparación

Disolver el doble de la cantidad indicada para los ingredientes utilizados en el agua peptonada tamponada en 1000 ml de agua destilada, y ajustar el pH del medio de manera que después de la esterilización sea de $7,0 \pm 0,1$. Distribuir en porciones adecuadas, en frascos o tubos de dilución. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos. También se puede preparar la solución y dispensar luego asépticamente en envases estériles.

ANEXO 2



Sembrar al menos 2 Placas por dilución

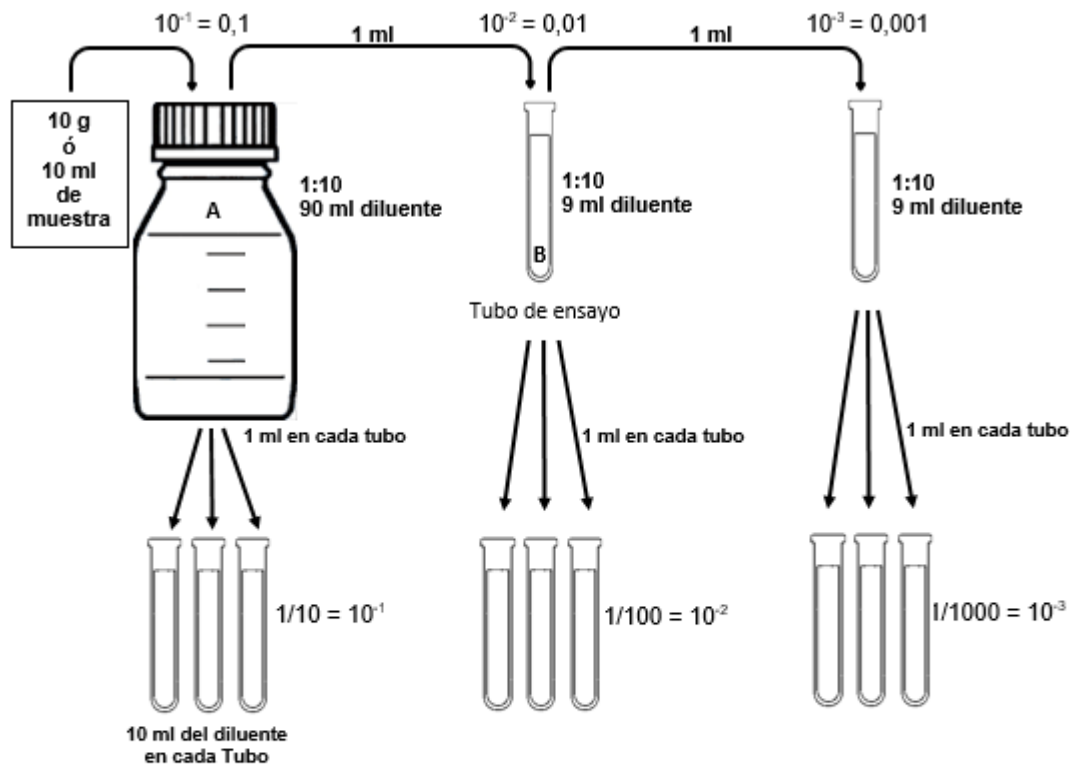
Cada dilución debe mantener la proporción 1:10 (1 parte de muestra 9 partes del diluyente).

Si la muestra es líquida se puede hacer la primera siembra directa (si se puede) en placas, no existe dilución su factor sería 10^0

- A. Frasco de rosca resistente al calor
- B. Tubo de ensayo
- C. Placa de Petri estéril

Figura 2.1 Representación esquemática del proceso de diluciones seriadas para métodos que reporten en UFC

ANEXO 2 Continuación



Cada dilución debe mantener la proporción 1:10 (1 parte de muestra 9 partes de diluyente).
Si la muestra es líquida se puede hacer la siembra directa (si se puede) en tubos, no existe dilución su factor sería 10⁰

- A. Frasco de rosca resistente al calor
- B. Tubo de ensayo

Figura 2.2 Representación esquemática del proceso de diluciones seriadas para métodos que reporten en NMP