
NORMA CUBANA

NC

ISO 7218: 2013
(Publicada por la ISO en 2007)

**MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y
ANIMAL — REQUISITOS GENERALES Y GUÍA PARA LOS
EXÁMENES MICROBIOLÓGICOS
(ISO 7218: 2007, IDT)**

Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and
guidance for microbiological examinations

ICS: 07.100.30

1. Edición Octubre 2013
REPRODUCCIÓN PROHIBIDA

Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 El Vedado, La Habana. Cuba.
Teléfono: 830-0835 Fax: (537) 836-8048; Correo electrónico: nc@ncnorma.cu; Sitio
Web: www.nc.cubaindustria.cu



Cuban National Bureau of Standards

NC-ISO 7218: 2013

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba y representa al país ante las organizaciones internacionales y regionales de normalización.

La elaboración de las Normas Cubanas y otros documentos normativos relacionados se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. Su aprobación es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en las evidencias del consenso.

Esta Norma Cubana:

- Ha sido elaborada, por el Comité Técnico de Normalización NC/CTN 61 de Microbiología, integrado por representantes de las siguientes entidades:
 - Ministerio de Salud Pública (DINSA-MINSAP)
 - Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (INHA-MINSAP)
 - Centro Nacional de Higiene de los Alimentos (IMV-MINAGRI)
 - Centro Nacional de Inspección de la Calidad (CNICA-MINAL)
 - Laboratorio de Cuba-Control S.A. (MINCEX)
 - Oficina Nacional de Normalización (ONN)
 - Instituto de Farmacia y Alimentos (UH-MES)
 - Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE- MINSAP)
 - Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)
 - Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP-MIP)
 - Laboratorio de Alimentación Social (CIDCI- MINCIN)
 - ALIMPORT (MINCEX)
 - Escuela de Hotelería y Turismo (MINTUR)
- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la versión en inglés de la Norma Internacional *ISO 7218:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations.*
- Incluye el Anexo A informativo y el Anexo B normativo.

© NC, 2013

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada en alguna forma o por medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias, fotografías y microfilmes, sin el permiso escrito previo de:

Oficina Nacional de Normalización (NC)

Calle E No. 261, El Vedado, La Habana, Habana 4, Cuba.

Impreso en Cuba.

Índice

Introducción.....	6
1 Objeto.....	7
2 Referencias normativas.....	7
3 Instalaciones.....	8
3.1 Generalidades	8
3.2 Consideraciones de seguridad	8
3.3 Diseño del laboratorio	9
3.4 Áreas del laboratorio	9
3.5 Diseño y adecuación de las instalaciones.....	10
3.6 Limpieza y desinfección.....	12
4 Personal.....	12
4.1 Generalidades	12
4.2 Competencia.....	12
4.3 Verificación de la competencia del personal.....	13
4.4 Higiene.....	13
5 Aparatos y equipos.....	13
5.1 Generalidades	13
5.2 Gabinetes de seguridad	14
5.3 Balanzas y diluidores gravimétricos	16
5.4 Homogenizadores, batidoras y mezcladoras	17
5.5 phmetro	18
5.6 Autoclave	19
5.7 Preparador de medios	20
5.8 Incubadora	21
5.9 Refrigerador y cámara fría	22
5.10 Congelador y ultra-congelador	23
5.11 Baño controlado termostáticamente	24
5.12.3. Mantenimiento	26
5.13 Horno de esterilización	26
5.14 Horno microondas	27
5.15 Fregadora de cristalería	28
5.16 Microscopio óptico	29
5.17 Quemador de gas o incinerador de alambre	29
5.18 Dispensador de medios de cultivo y reactivos	30
5.19 Agitador de vórtice	31
5.20 Contador de colonias	31
5.21 Equipo para cultivo en una atmósfera modificada	32
5.22 Centrífuga	33
5.23 Plancha de calentamiento y manta de calefacción	33
5.24 Sembrador en espiral	34
5.25 Destiladores, desionizadores y unidades de ósmosis inversa.....	35
5.26 Relojes automáticos y cronómetros.....	36
5.27 Pipetas y pipeteadores	36

5.28 Termómetros e instrumentos de monitoreo de temperatura, incluyendo registros automáticos	37
5.29 Separador inmunomagnético	39
5.30 Sistema de filtración	39
5.31 Otros equipos y software.....	40
6 Preparación de la cristalería y otros materiales de laboratorio.....	40
6.1 Preparación.....	40
6.2 Esterilización / descontaminación	40
6.3 Equipo y materiales desechables	41
6.4 Almacenamiento de cristalería limpia y materiales	41
6.5 Manejo de cristalería estéril y materiales	41
6.6 Utilización de la descontaminación y desinfección	41
6.7 Manejo de los desechos.....	42
6.8 Fregado	42
7 Preparación y esterilización de medios de cultivo y reactivos.....	43
8 Muestras de laboratorio.....	43
8.1 Muestreo	43
8.2 Transporte.....	43
8.3 Recepción	44
8.4 Almacenamiento	45
8.5 Porción de ensayo	45
9 Examen.....	46
9.1 Precauciones higiénicas durante el análisis	46
9.2 Preparación de la suspensión inicial y las diluciones	47
10 Enumeración.....	48
10.1 Generalidades	48
10.2 Enumeración empleando un medio sólido	49
10.3 Cálculo y expresión de los resultados obtenidos con medios sólidos	52
10.4 Enumeración de levaduras y hongos filamentosos	60
10.5 Enumeración empleando un medio líquido.....	60
11 Método de detección (método cualitativo).....	67
11.1 Generalidades	67
11.2 Principio	67
11.3 Medición de la incertidumbre	68
12 Métodos de confirmación.....	68
12.1 Generalidades	68
12.2 Preparación de un cultivo puro.....	68
12.3 Tinción de gram (técnica modificada de hucker).....	68
12.4 Uso de las galerías bioquímicas para la identificación.....	70
12.5 Uso de pruebas nucleicas para la identificación	71
12.6 Métodos serológicos	71

13 Informe de ensayo.....	72
14 Validación de métodos microbiológicos.....	73
14.1 Validación de métodos de referencia.....	73
14.2 Validación de métodos alternativos.....	73
14.3 Validación de métodos propios.....	73
15 Aseguramiento de la calidad de los resultados / control de calidad del rendimiento	73
15.1 Control interno de la calidad.....	73
15.2 Cepas de referencia.....	74
15.3 Ensayos externos de calidad (ensayos de aptitud).....	74
Anexo A (informativo).....	72
Propiedad de algunos desinfectantes.....	72
Anexo B (normativo).....	76
Determinación del número más probable (nmp).....	76
Bibliografía.....	83

Introducción

Durante la ejecución de los exámenes microbiológicos es especialmente importante que:

- solamente aquellos microorganismos que están presentes en las muestras se aíslen y enumeren;
- los microorganismos no contaminen el ambiente.

Es necesario, para lograr esto, poner atención a la higiene del personal y al uso de técnicas de trabajo que aseguren, tanto como sea posible, la exclusión de contaminación foránea.

Ya que en esta norma solo es posible dar algunos ejemplos de las precauciones que deben tomarse durante los exámenes microbiológicos, es esencial conocer a profundidad las técnicas microbiológicas y los microorganismos involucrados. Es importante que los análisis se ejecuten de forma tan segura como sea posible, incluyendo aspectos de monitoreo y registro que pueden afectar los resultados y el cálculo del número de microorganismos y la incertidumbre de los resultados.

En última instancia, es responsabilidad del jefe del laboratorio juzgar si las manipulaciones son seguras y pueden ser consideradas como buenas prácticas de laboratorio.

Un gran número de manipulaciones puede, por ejemplo, conducir involuntariamente a la contaminación cruzada y el analista debe verificar siempre la exactitud de los resultados dados por sus técnicos.

En este sentido, para ejecutar los exámenes correctamente, es necesario tomar ciertas precauciones cuando se construye y equipar un laboratorio.

Tienen que tomarse determinadas precauciones, no sólo por razones de higiene, sino también para asegurar una buena reproducibilidad de los resultados. No es posible especificar todas las precauciones que deben tomarse en todas las circunstancias, pero esta norma, al menos ofrece las principales medidas a adoptar cuando se preparan, esterilizan y almacenan los medios y cuando se usa el equipamiento.

Si se siguen las reglas dadas en esta norma, se contribuirá a la protección de la salud y de la seguridad del personal. Sobre este tema se ofrece información adicional en la literatura que aparece en la Bibliografía.

Para distinguir la guía orientativa dentro de esta norma, se ha impreso en un tipo de letra diferente (Times New Roman).

MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE CONSUMO HUMANO Y ANIMAL – REQUISITOS GENERALES Y GUÍA PARA LOS EXÁMENES MICROBIOLÓGICOS

1 Objeto

Brinda los requerimientos generales y las guías y opciones establecidas para tres usos principales:

- implementación de las normas ISO/TC 34/SC 9 ó ISO/TC 34/SC 5 para la detección o la enumeración de microorganismos, denominadas posteriormente "normas específicas";
- buenas prácticas de laboratorio para laboratorios de microbiología de alimentos (el propósito no es detallarlas en esta norma, existen manuales disponibles para ese propósito);
- guía para la acreditación de los laboratorios de microbiología de alimentos (esta norma describe los requisitos técnicos de acuerdo con el Anexo B de la NC-SO17025 para la acreditación de un laboratorio de microbiología por organizaciones nacionales).

Los requisitos de esta norma reemplazan, de existir, a los correspondientes de las normas específicas.

En la norma ISO 22174 se especifican las instrucciones adicionales en el campo de los exámenes de biología molecular.

Esta norma cubre el examen para bacterias, levaduras y hongos filamentosos y puede usarse si se complementan con la guía específica para priones, parásitos y virus. No cubre el examen para toxinas u otros metabolitos de microorganismos (por ejemplo: aminas).

Esta norma se aplica a la microbiología de los alimentos, alimentos de consumo animal, el ambiente de la producción de alimentos y el ambiente de la producción primaria.

El propósito de esta norma es ayudar a garantizar la validez de los exámenes microbiológicos de los alimentos, cerciorándose de asegurar que las técnicas generales empleadas para llevar a cabo estos exámenes son las mismas en todos los laboratorios, para ayudar a lograr resultados homogéneos en diferentes laboratorios, y contribuir a la protección de la salud del personal del laboratorio previendo los riesgos de infección.

2 Referencias normativas

Las siguientes normas son indispensables para la aplicación de este documento. Para las referencias fechadas, solamente la edición citada es aplicable. Para las referencias no fechadas, se aplica la edición más reciente del documento referido (incluyendo cualquier corrección).

ISO 835 (todas las partes), Cristalería de laboratorio – Pipetas graduadas

NC-ISO 6887-1 Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Preparación de muestra de ensayo, suspensión inicial y disoluciones decimales para pruebas microbiológicas. Parte 1: Reglas generales para preparación de suspensión inicial y disoluciones decimales.

ISO 6887 (todas las partes), Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Preparación de las muestras de ensayo, las suspensiones iniciales y las diluciones decimales para exámenes microbiológicos.

ISO 8199, Calidad del agua - Guía general para la enumeración de microorganismos por cultivo.

ISO 8261, Leche y productos lácteos - Guía general para la preparación de muestras de ensayo, suspensiones iniciales y diluciones decimales para examen microbiológico.

ISO 8655-1, Aparatos volumétricos operados por pistón - Parte 1: Terminología, requisitos generales y recomendaciones para el usuario.

NC-ISO/TS 11133 (todas las partes), Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Guías en la preparación y producción de medios de cultivo.

ISO 16140 Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Protocolo para la validación de los métodos alternativos.

ISO/TS 19036, Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Guías para la estimación de la incertidumbre para determinaciones cuantitativas.

ISO 22174, Microbiología de alimentos de consumo humano y animal – Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de agentes a través de los alimentos. Requisitos generales y definiciones.

3 Instalaciones

3.1 Generalidades

Este capítulo ofrece los requisitos generales, por ejemplo, los principios del diseño y organización, para la disposición de locales de un laboratorio de microbiología.

El examen de las muestras de la etapa de la producción primaria (especialmente para la recepción y preparación de la muestra) deberá separarse del examen de otras muestras para reducir los riesgos de contaminación cruzada.

3.2 Consideraciones de seguridad

El diseño del laboratorio cumplirá con los requisitos de seguridad que dependerán del tipo de microorganismo. Con ese fin, los microorganismos se clasifican en cuatro categorías de riesgo:

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

Un microorganismo que no es probable que cause enfermedad al ser humano o al animal.

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

Un patógeno que puede causar enfermedad al ser humano o al animal, pero que no es probable que sea un serio peligro para los trabajadores de los laboratorios, la comunidad o el ambiente. Las exposiciones del laboratorio podrían causar seria infección humana, pero el tratamiento efectivo y las medidas preventivas están disponibles y el riesgo de la expansión de la infección es limitado.

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

Un patógeno que generalmente causa enfermedad seria al ser humano o al animal, pero no se transmite ordinariamente de un individuo infectado a otro. Están disponibles el tratamiento efectivo y las medidas preventivas.

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

Un patógeno que causa enfermedad grave al ser humano o al animal y que puede transmitirse fácilmente, directa o indirectamente, de un individuo a otro. Generalmente no están disponibles el tratamiento efectivo y las medidas preventivas.

ADVERTENCIA — Remitirse a las regulaciones nacionales, las cuales definirán, en particular, la categoría de riesgo de los microorganismos encontrados dentro de las fronteras del país.

3.3 Diseño del laboratorio

Las guías para el diseño del laboratorio descritas para los exámenes de detección de microorganismos pertenecen a la categoría de riesgo 1, 2 y 3 para microbiología de alimentos.

Debería notarse que podrían ser necesarias medidas de seguridad adicionales en dependencia de la legislación local.

3.4 Áreas del laboratorio

3.4.1 Generalidades

El laboratorio comprende áreas relacionadas con muestras y ensayos (ver 3.4.2) y áreas generales (Ver 3.4.3). Éstas deberán estar separadas.

3.4.2 Áreas relacionadas con muestras y ensayos

Se consideran buenas prácticas tener locales separados, o áreas claramente designadas, para lo siguiente:

- recepción y almacenamiento de las muestras;
- preparación de las muestras, particularmente en el caso de las materias primas (por ejemplo: productos en polvo con alto número de microorganismos);
- examen de las muestras (desde la suspensión inicial), incluyendo la incubación de microorganismos;
- manipulación de patógenos presuntivos;
- almacenamiento de cepas de referencia y otras cepas;
- preparación y esterilización de medios de cultivo y equipos;
- almacenamiento de medios de cultivo y reactivos; prueba de esterilidad a conservas alimenticias;
- descontaminación;
- fregado de la cristalería y otros equipos;

- almacenamiento de sustancias químicas de riesgo, mantenidas en gabinetes, almacenes, cuartos o edificaciones especialmente diseñados para ello.

3.4.3 Áreas generales

Deben considerarse áreas separadas para lo siguiente:

- entradas, pasillos, escaleras, elevadores;
- áreas administrativas (por ejemplo: secretaría, oficinas, centros de documentación, etc.);
- taquillas y servicios sanitarios;
- archivos;
- almacenes;
- áreas de descanso.

3.5 Diseño y adecuación de las instalaciones

3.5.1 Objetivos

El objetivo es asegurar que el ambiente en el cual se llevan a cabo los exámenes microbiológicos, no afecte la confiabilidad de los resultados de los ensayos.

Organice los locales de forma tal que se evite el riesgo de la contaminación cruzada. Las vías para alcanzar este objetivo, por ejemplo son:

- a) construir el laboratorio acorde al principio “de marcha hacia delante”;
- b) llevar a cabo procedimientos de manera secuencial utilizando precauciones apropiadas para asegurar la integridad de la muestra y del ensayo (por ejemplo: uso de contenedores herméticos);
- c) separar las actividades en tiempo y espacio.

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

Debería mantenerse un espacio suficiente para permitir que las áreas de trabajo se mantengan limpias y ordenadas. El espacio debería ser el indicado en las legislaciones nacionales, cuando éstas existan.

3.5.2 Características

Para reducir el riesgo de contaminación con polvo del ambiente, y por consiguiente, con microorganismos (consulte las legislaciones nacionales para los microorganismos de nivel de seguridad 3), las instalaciones donde se realizan los análisis deberían estar construidas y equipadas del modo siguiente:

- a) Las paredes, techos y pisos deben ser lisos, fáciles de limpiar y resistentes a los detergentes y desinfectantes usados en los laboratorios.
- b) Los pisos deben ser antirresbalantes.

- c) Las tuberías aéreas que transportan fluidos no deben cruzar los locales a menos que estén herméticamente encerradas. Cualquier otra estructura aérea debe estar recubierta o tener acceso adecuado para la limpieza regular.
- d) Las ventanas y las puertas deben permanecer cerradas, cuando se realizan los ensayos para minimizar las corrientes de aire. Además, deben diseñarse de forma tal que se evite la formación de trampas de polvo y facilitar así su limpieza. La temperatura ambiente (18 °C a 27 °C) y la calidad del aire (contenido de microorganismos, grado de difusión del polvo, etc.) deben ser compatibles con los ensayos que se llevan a cabo. Para este propósito se recomienda un sistema de ventilación de filtro para el aire que entra.
- e) Debe instalarse un adecuado sistema de extracción para prevenir la exposición al polvo que se levanta por la manipulación de medios de cultivo deshidratados, y por las muestras en polvo o deshidratadas.
- f) Cuando los ensayos se realicen en una atmósfera de baja contaminación, el local debe estar especialmente equipado con un gabinete limpio de flujo laminar y/o con una cabina de seguridad.
- g) Si es necesario, el ambiente del laboratorio debe protegerse de los efectos nocivos de la radiación solar con el uso de contraventanas o paneles de cristal tratados. No deben colocarse cortinas internas, ya que esto podría dificultar la limpieza y podría convertirse en una fuente de polvo.

3.5.3 Otros aspectos

Los siguientes aspectos deberán considerarse:

- disponibilidad de suministro de agua, de calidad apropiada para el uso que se le designe;
- disponibilidad de electricidad;
- disponibilidad de gas (por tubería o de balón);
- adecuada iluminación en toda sección del laboratorio;
- las mesetas de trabajo y el mobiliario del laboratorio fabricados con un material liso e impermeable, tal que facilite la limpieza y la desinfección;
- el mobiliario del laboratorio diseñado de forma que se facilite la limpieza de los pisos (por ejemplo: muebles que sean móviles);
- en las áreas de ensayo no debe haber muebles, documentos u otros artículos que no sean los estrictamente necesarios;
- disponibilidad de mobiliario para almacenamiento de documentos, registros que se utilicen en el laboratorio relacionado con el estudio de muestras, medios de cultivo, reactivos, etc.;
- disponibilidad de un lavamanos en cada cuarto de ensayo y, si es necesario, en las áreas generales, preferiblemente cerca de la puerta.;
- disponibilidad de un autoclave para destrucción de materiales de desecho y medios de cultivo contaminados, a menos que se cuente con un apropiado sistema para remoción de los desechos contaminados por incineración;

- provisión de sistemas de seguridad contra incendios, emergencia eléctrica e instalaciones para duchado y lavado de los ojos ante una emergencia;
- provisiones para primeros auxilios.

3.6 Limpieza y desinfección

Se deben controlar los siguientes aspectos:

- a) Los pisos, paredes, techos, mesetas de trabajo del laboratorio, mobiliario y uniones entre estos, deben estar sujetos a mantenimiento y reparaciones regulares para evitar roturas las cuales pueden ser fuente de contaminación.
- b) La limpieza y la desinfección regular debe llevarse a cabo, para mantener las instalaciones en condiciones adecuadas para la ejecución de los ensayos. Las superficies contaminadas o potencialmente contaminadas deben descontaminarse usando desinfectantes que se conozcan que sean bactericidas y fungicidas.

NOTA 1 Los cuartos y el equipamiento pueden ser descontaminados con vapores de formaldehído, si se permite por la regulación nacional.

- c) Los sistemas de ventilación y sus filtros deben recibir mantenimiento regularmente, y los filtros deben cambiarse cuando sea necesario.
- d) La calidad microbiológica de las superficies de trabajo del laboratorio, de las superficies de contacto del personal y del aire, deben monitorearse regularmente (la frecuencia depende de los resultados de los ensayos previos).
- e) La contaminación de la superficie puede estimarse aplicando directamente a la superficie una placa de contacto que contenga los agentes neutralizantes contra los higienizantes (ejemplo: lecitina, tiosulfato de sodio). La calidad del aire puede examinarse exponiendo 15 min. una placa de Petri abierta que contenga un medio sólido no selectivo (ejemplo: agar para conteo en placa – PCA) o un medio sólido selectivo apropiado para el microorganismo objeto de estudio que se busca (ejemplo: hongos filamentosos).

NOTA 2 Pueden usarse también otros métodos para estimar la contaminación de las superficies y el aire. Ver ISO 18593.

4 Personal

4.1 Generalidades

Los requisitos generales de la competencia del personal pueden encontrarse en la NC-ISO/IEC 17025.

4.2 Competencia

Para cada método o técnica, el criterio objetivo se definirá por la evaluación de la competencia apropiada, tanto al inicio como después de establecido el método o técnica.

La competencia puede establecerse dentro del laboratorio a través del control interno (ver 15.1.2).

NOTA Una de las vías para investigar las causas del pobre desempeño (pipeteo, homogenización deficiente de la dilución inicial, conteo, etc.) en el caso de la enumeración por conteo de colonias se ofrece en la ISO 14461-1.

4.3 Verificación de la competencia del personal

La verificación de la competencia del personal debe evaluarse regularmente contra parámetros objetivos. Esto incluye la participación en programas de aseguramiento internos de calidad, ensayos de aptitud (ver NC-ISO/IEC 17043-1), el uso de materiales de referencia o de ensayo de autoevaluación para enumeración de microorganismos, como se describe en la ISO 14461-2.

4.4 Higiene

Se tomarán las siguientes precauciones con respecto a la higiene del personal para evitar la contaminación de las muestras y de los medios de cultivo y para evitar el riesgo de infección del personal.

a) Utilice ropa de laboratorio adecuado, que esté limpia y en buenas condiciones, confeccionada con un tejido que no sea fácilmente inflamable. Si es posible esta ropa no deberá ser utilizada fuera de las áreas de trabajo, ni en los guardarropas.

b) Protéjase el pelo y la barba, en caso necesario, para conservar la integridad de la muestra.

c) Mantenga las uñas limpias y preferiblemente cortas.

d) Lávese las manos vigorosamente con agua tibia, suministrada preferiblemente por una pila de mando no manual, antes y después de los exámenes microbiológicos e inmediatamente después de ir al baño. Emplee jabón líquido o en polvo, o posiblemente un higienizante, que se aplique a partir de un dispensador que se mantenga en un correcto estado de limpieza. Para secarse las manos, utilice toallas de papel o tela desechables. Estas precauciones se aplican tanto al personal del laboratorio como a los visitantes.

e) Cuando trabaje con muestras expuestas, cultivos, medios y cuando esté inoculando evite hablar, toser, etc.

f) Las personas que tengan algún tipo de infección o enfermedad tomarán precauciones, ya que los microorganismos de estas son probables de contaminar las muestras y podrían invalidar los resultados.

g) No coma o ingiera bebidas en el laboratorio y no coloque alimentos para consumo personal en los refrigeradores o congeladores del laboratorio.

h) Se prohíbe pipetear con la boca.

5 Aparatos y equipos

5.1 Generalidades

De acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, todos los aparatos y equipos deben mantenerse limpios y en buenas condiciones de trabajo. Antes del uso, los equipos deben verificarse como aptos para el propósito para el cual fueron destinados y su funcionamiento debe ser monitoreado durante su uso, de forma apropiada.

Cuando sea necesario, debe calibrarse el equipamiento y los dispositivos de monitoreo, acorde a los patrones nacionales trazables, y debe ejecutarse la recalibración y cualquier control intermedio y tener documentados los procedimientos y los resultados.

El equipamiento debe tener control y mantenimiento regulares, para garantizar su seguridad y que se encuentre apto para el uso. El equipamiento debe ser monitoreado acorde a las condiciones de trabajo y a la exactitud demandada para los resultados.

La frecuencia de los chequeos de calibración y verificación de cada pieza del equipamiento, en la mayoría de los casos, no se especifica en esta Norma Cubana, ya que deberá ser determinada por cada laboratorio, en dependencia del tipo de equipamiento y del nivel de actividad del laboratorio, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En un número limitado de casos, se ha especificado una frecuencia, ya que se consideró que era esencial.

Los aparatos y equipos se construirán e instalarán de forma que faciliten la operación y permitan la facilidad del mantenimiento, la limpieza, la descontaminación y la calibración.

Cualquier medición de incertidumbre dada en esta cláusula es concerniente a los aparatos y equipos específicos y no al método completo de análisis.

A través de esta cláusula se ofrecen los requerimientos para la exactitud de la medición de los equipos de medición. Estos se basan en la tolerancia práctica requerida para demostrar el control apropiado del equipamiento de uso rutinario. La exactitud establecida está relacionada con la incertidumbre metrológica del dispositivo (ver Guía ISO 99).

Para equipos de control de temperatura, monitoree la estabilidad y homogeneidad de la temperatura antes de comenzar a usarlos y después de cualquier reparación o modificación que podría tener un efecto en el control de la temperatura.

5.2 Gabinetes de seguridad

5.2.1 Descripción

Un gabinete protector es un puesto de trabajo con flujo de aire laminar horizontal o vertical para remover el polvo y otras partículas, tales como microbios, del aire.

El número máximo de partículas tolerables por metro cúbico con una talla mayor o igual a $0.5 \mu\text{m}$ representa la clase de difusión del polvo de un gabinete de seguridad. Para los gabinetes utilizados en microbiología de los alimentos, el número de partículas no excederá las 4 000 por metro cúbico.

Los gabinetes que se usan en los laboratorios de microbiología de los alimentos son de cuatro tipos:

a) Los gabinetes de seguridad clase I son gabinetes con protección a los escapes abiertos por el frente, que están destinados a proteger el operador y el ambiente, pero no protege el producto de

la contaminación externa. Pueden ser contenidos aerosoles infectados potencialmente dentro del gabinete y atrapados en el filtro por impacto. El aire filtrado se descarga normalmente a la atmósfera; si esto no sucede, el aire deberá pasar a través de dos filtros HEPA montados en serie. Estos gabinetes no se recomiendan para trabajar con patógenos de categoría de riesgo 3 debido a las dificultades para mantener y asegurar la protección adecuada al operador.

b) Los gabinetes de seguridad clase II protegen al producto, al operador y al ambiente. Ellos recirculan parte del aire filtrado de la contaminación externa, expulsan una parte a la atmósfera y toman el aire que se repone a través de las aperturas de trabajo, con esto ofrecen protección al operario. Estos gabinetes pueden emplearse para el trabajo con patógenos con categoría de riesgo 3.

c) Los gabinetes de flujo laminar horizontal protegen el trabajo de la contaminación, pero envían los aerosoles que se generan a la cara del operario. Por tanto, estos gabinetes no son convenientes para manipular cultivos inoculados o para preparación de cultivo de tejidos.

d) Los gabinetes con flujo de aire laminar vertical protegen el producto debido al uso del flujo laminar vertical del aire que pasa por filtro HEPA. Estos gabinetes también protegen al operario por el uso de aire recirculado internamente. Son particularmente convenientes para garantizar un ambiente aséptico para manipular productos estériles y para proteger al operario cuando manipule productos en polvo.

Use gabinetes de seguridad para todo tipo de trabajo que involucre la manipulación de patógenos y productos en polvo contaminados, si es requerido por las regulaciones nacionales.

No se recomienda el uso de quemadores de gas o incinerador en los gabinetes protectores. Si esto es necesario, el mechero de gas debe tener una llama pequeña tal que no perturbe el flujo de aire. El uso de equipos desechables (asas, pipetas, etc.) es una alternativa posible.

5.2.2 Uso

Los gabinetes deben mantenerse libres de equipos tanto como sea posible.

En la práctica, coloque todo lo que se necesite dentro del gabinete antes de comenzar a trabajar, para minimizar el número de movimientos de los brazos dentro y fuera de la apertura de trabajo. Ubique los equipos y materiales de forma tal que minimice la perturbación del flujo de aire en la apertura de trabajo.

Los operarios deberán estar adecuadamente entrenados en el uso correcto de los gabinetes para garantizar su seguridad y la integridad del producto o del cultivo.

5.2.3 Limpieza y desinfección

Limpie y desinfecte el área de trabajo después de su uso con un desinfectante apropiado no corrosivo, de acuerdo con las instrucciones del productor. Examine regularmente las rejillas que protegen los prefiltros y limpie frotando con un paño humedecido con desinfectante.

Para los gabinetes de flujo laminar, la cara del filtro debe limpiarse al vacío regularmente, cuidando no dañar el filtro medio.

Los gabinetes de seguridad deben fumigarse antes de cambiar o iniciar el uso del filtro. Después de la limpieza de los gabinetes, podrían emplearse lámparas UV para la desinfección. Las lámparas UV deben limpiarse regularmente y remplazarse de acuerdo con las instrucciones del productor.

5.2.4 Mantenimiento e inspección

Utilice gabinetes protectores que sean apropiados para la aplicación destinada y para las condiciones ambientales del laboratorio.

La eficiencia de un gabinete protector deberá ser controlada por un personal calificado una vez que se reciba y de ahí en adelante en intervalos regulares de acuerdo con las recomendaciones del productor, así como después de cualquier reparación o modificación.

La verificación periódica de que se encuentra libre de cualquier contaminación microbiana debe efectuarse mediante un control de las superficies y paredes del gabinete.

Una verificación periódica del número de microorganismos presentes en el aire deberá efectuarse durante la operación de los filtros empleando el equipamiento usual. Por ejemplo, exponga varias placas de Petri abiertas que contengan un medio de cultivo sólido no selectivo (por ejemplo: PCA) en cada gabinete durante 30 minutos. También pueden emplearse otros métodos.

5.3 Balanzas y diluidores gravimétricos

5.3.1 Uso y medición de la incertidumbre

Las balanzas se utilizan fundamentalmente para pesar la porción de ensayo de la muestra a analizar y los componentes de los medios de cultivo y los reactivos. También pueden ser utilizadas para llevar a cabo las mediciones de volúmenes fluidos de las diluciones a través de la masa.

Los diluidores gravimétricos son instrumentos electrónicos que consisten en una balanza y un dispensador de líquido programable y se usan durante la preparación de las suspensiones iniciales de la muestra; funcionan por adición del diluyente a una submuestra en una proporción fijada. La submuestra entonces se pesa a la tolerancia especificada en la aplicación, y el diluidor se fija para dispensar diluyente suficiente para la proporción requerida (ejemplo 9 a 1 para diluciones decimales).

Un laboratorio de microbiología de alimentos deberá estar equipado con balanzas del rango y la medición de la incertidumbre requeridos para los diferentes productos a pesar.

A menos que se establezca otra cosa, los errores máximos permisibles deberán ser del 1 % o mejores cuando se pesen las muestras de ensayo.

Coloque el equipo en una superficie horizontal estable, ajustada como sea necesario para asegurar que esté nivelada y protegida de la vibración y de las corrientes de aire.

5.3.2 Limpieza y desinfección

El equipo deberá limpiarse y desinfectarse después de su uso o si hay un derrame durante la pesada, con un desinfectante apropiado no corrosivo.

5.3.3 Verificación del desempeño y calibración

El funcionamiento del sistema de la balanza será verificado regularmente durante el uso y después de la limpieza por medio del control de los pesos por personal entrenado. La calibración deberá ser chequeada a través de un rango completo por un personal calificado, con una frecuencia que depende del uso del equipo.

El control de los pesos podría también ser verificado inmediatamente después de la calibración de la balanza.

5.4 Homogenizadores, batidoras y mezcladoras

5.4.1 Descripción

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

Los siguientes aparatos pudieran utilizarse:

- un homogenizador peristáltico (“stomacher”) con bolsas estériles, posiblemente con un dispositivo para ajustar la velocidad y el tiempo; o
- un homogenizador rotatorio (batidora), la velocidad rotacional del cual se encuentra entre 8 000 r/min. y 45 000 r/min. inclusive, con vasos de metal o cristal esterilizables, equipados con tapas; o
- un mezclador vibracional (pulsificador) con bolsas estériles; u
- otro sistema de homogenización con eficiencia equivalente.

En ciertos casos, la homogenización puede llevarse a cabo con perlas de vidrio estériles que tengan un diámetro apropiado (aproximadamente 6 mm; ver ISO 6887-2 a ISO 6887-4 e ISO 8261).

5.4.2 Uso

El tiempo usual de operación de un homogenizador peristáltico es de 1 min. a 3 min. (ver ISO 6887-2 a ISO 6887-4 e ISO 8261 para alimentos específicos).

No use este tipo de aparatos para ciertos alimentos, tales como:

- productos con los cuales se corra el riesgo de perforar la bolsa (debido a la presencia de partículas afiladas, duras o secas);
- productos difíciles de homogenizar debido a su textura (por ejemplo, los embutidos de tipo salami).

El homogenizador rotatorio operará durante un tiempo tal que el número de revoluciones esté, inclusive, entre 15 000 r/min. y 20 000 r/min. Incluso con el homogenizador más lento, este tiempo no excederá los 2,5 min.

La mezcladora vibracional puede usarse para la mayoría de los alimentos, incluyendo productos duros o secos. El tiempo usual de operación es de 0,5 min. a 1 min. Si los microorganismos son probables de ser encontrados en lo profundo dentro de estructuras cohesivas, la muestra debe cortarse en piezas pequeñas antes del procesamiento.

Las perlas de vidrio pueden utilizarse para la preparación, por agitación, de las suspensiones iniciales de ciertos productos viscosos o espesos, en particular ciertos productos lácteos (ver las normas específicas).

5.4.3 Limpieza y desinfección

Limpie y desinfecte los homogenizadores peristálticos y las mezcladoras vibracionales regularmente y después que cualquier bolsa se derrame o se rompa.

Para homogenizadores rotatorios, limpie y esterilice el recipiente de cristal o metal después de cada uso.

5.4.4 Mantenimiento

Realice la inspección y mantenimiento del equipamiento acorde con las instrucciones del fabricante.

5.5 Medidor de pH

5.5.1 Descripción

Un medidor de pH se utiliza para medir la diferencia de potencial, a una temperatura determinada, entre un electrodo de medición y uno de referencia, siendo introducidos ambos electrodos dentro del producto. Este será capaz de medir con una exactitud de $\pm 0,05$ unidades de pH y su resolución deberá ser 0,01 unidades de pH. El medidor de pH deberá estar equipado con un igualador de temperatura manual o automático.

NOTA El electrodo de medición y el de referencia suelen estar agrupados en un sistema de electrodos combinado.

5.5.2 Uso

Un medidor de pH se emplea para medir el pH de los medios de cultivo y reactivos, para controlar si es necesario ajustarlos durante su preparación, así como para el control de la calidad después de la esterilización.

También puede emplearse para medir el valor de pH de las muestras y suspensiones de las muestras. El empleo del medidor de pH se discute en la norma específica del producto a analizar, en la cual se especifican las condiciones para la determinación y ajuste del valor de pH.

Ajuste el medidor de pH como se indica en el manual del fabricante para medir el valor de pH a una temperatura estandarizada, ejemplo 25 °C. Lea el valor de pH después que alcance la estabilidad. Registre el valor de pH para dos lugares decimales.

NOTA La lectura puede considerarse estable cuando el valor de pH medido en un periodo de 5 s no varíe más de 0,02 unidades de pH. Empleando electrodos en buenas condiciones, el equilibrio se alcanza normalmente dentro de los 30 s.

5.5.3 Verificación y calibración

Verifique el medidor de pH de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando, al menos dos y preferiblemente tres, soluciones buffer estándar, al menos una diariamente antes del uso. Defina los errores máximos permisibles para su verificación, en dependencia del uso.

Las soluciones estándar deberán tener valores de pH específicos para dos lugares decimales a la temperatura de medición (en general, pH 7,00 y pH 4,00 y/o pH 9,00 a 25 °C, de acuerdo con las instrucciones del fabricante). Los estándares usados comprenderán el valor de pH a ser medido.

Después de la verificación del medidor de pH con las dos soluciones buffer estándar trazables, el pH debe controlarse por el uso de un tercer buffer, denominado buffer control, ejemplo pH 5 u 8.

Calibre el medidor de pH cuando las verificaciones den un resultado fallido fuera de los errores máximos permisibles y de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

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

5.5.4 Mantenimiento

Controle y mantenga los electrodos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Es necesario, en particular, monitorear regularmente

- la condición de los electrodos con respecto al deterioro por el tiempo y la suciedad; y
- el tiempo de respuesta y la estabilidad.

Enjuague los electrodos con agua destilada o desionizada después de cada uso. De acuerdo con el deterioro y la suciedad de los mismos, límpielos regularmente más a fondo según las instrucciones del fabricante.

Almacene los electrodos de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.6 Autoclave

5.6.1 Descripción

Una autoclave proporciona una temperatura de vapor saturado que se obtiene en la cámara, y se emplea para la destrucción de los microorganismos.

El autoclave debe estar equipado con:

- al menos una válvula de seguridad,
- un grifo de drenaje,
- un dispositivo de regulación que permita que la temperatura en la cámara se mantenga dentro de ± 3 °C de la temperatura fijada (tomar en cuenta la medición de la incertidumbre asociada con el termopar de medición), y
- una prueba de temperatura o un termopar con registro.

También debe estar equipada con un cronómetro y un registrador de temperatura.

5.6.2 Uso

Con la esterilización al vapor, todo el aire se expulsa por una válvula de presión. Si la autoclave no tiene un dispositivo de evacuación automático, 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 tener una temperatura de al menos 121 °C.

Durante el mismo ciclo de esterilización, no use la autoclave para esterilizar el equipamiento limpio (y/o medios de cultivo) y para descontaminar también el equipamiento usado (y/o medios de cultivo usados).

Es preferible emplear autoclaves separadas para estos dos procesos. Después de autoclavar, todos los materiales y equipos deben enfriarse dentro de la autoclave antes de su extracción.

Por razones de seguridad, no extraiga el contenido hasta que la temperatura no se encuentre por debajo de 80 °C aproximadamente.

5.6.3 Mantenimiento

Limpie la cabina, el filtro de drenaje y los cierre la tapa, regularmente. Verifique la integridad del sellado de la tapa. Lleve a cabo las operaciones de drenaje y desincrustado, si es necesario, a intervalos regulares. Siga las instrucciones del fabricante.

5.6.4 Verificación y calibración

La autoclave deberá mantenerse en buenas condiciones de funcionamiento y deberá inspeccionarse regularmente por personal calificado competente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Mantenga todos los instrumentos de monitoreo en perfectas condiciones de trabajo y verifíquelos regularmente.

La validación inicial debe incluir estudios de desempeño para cada ciclo de operación y cada configuración de carga usada en la práctica. Este proceso debe repetirse después de una reparación o modificación significativas. Deben colocarse suficientes sensores de temperatura dentro de la carga para demostrar la adecuada penetración del calor en todas las locaciones. La validación y revalidación deben considerar la proporción de tiempos en que se eleva y baja la temperatura, así como la temperatura de esterilización

Para cada carga, como mínimo, debe incluirse un indicador de proceso en el centro de la misma para verificar el proceso de calentamiento cuando no exista un registro trazable de la eficiencia del proceso.

5.7 Preparador de medios**5.7.1 Descripción**

Un preparador de medios está diseñado principalmente para la esterilización de grandes volúmenes de medio (> 1 L). Consiste en un vaso de calentamiento, una chaqueta de agua y un

dispositivo de agitación continuo. El equipo deberá contar con un medidor de agua, un medidor de presión, un cronómetro y una válvula de seguridad.

Además, la unidad debe tener un cierre de seguridad para prevenir la apertura hasta que se alcance una temperatura < 80 °C.

5.7.2 Uso

Siga siempre las instrucciones del fabricante.

El proceso de producción completo tiene lugar dentro del aparato. Después de añadir todos los ingredientes, estos se disuelven por agitación y calentamiento. Esto es seguido por la esterilización.

5.7.3 Mantenimiento

Lave el preparador y enjuague vigorosamente con agua purificada entre cada lote de medio.

5.7.4 Verificación

El preparador deberá mantenerse en buenas condiciones de trabajo y deberá inspeccionarse regularmente por personal calificado competente de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Mantenga los instrumentos de monitoreo en buenas condiciones de trabajo y verifique su desempeño regularmente.

La validación inicial debe incluir estudios de desempeño para cada ciclo de operación y cada tamaño de carga usado en la práctica. Este proceso debe repetirse después de una reparación o modificación significativas. Pueden probarse dos temperaturas, una contigua para la prueba control y otra alejada de esta, para demostrar la uniformidad del calentamiento.

Debe chequearse la temperatura y la duración de cada ciclo.

5.8 Incubadora

5.8.1 Descripción

Una incubadora está formada por una cámara aislada que permite que la temperatura permanezca estable y distribuida uniformemente dentro del error máximo permisible de temperatura que se especifica en el método de ensayo.

5.8.2 Uso

Las incubadoras deben estar equipadas con un sistema de regulación que permita mantener la temperatura u otros parámetros, de forma uniforme y estable durante todo su volumen de trabajo. Defina el volumen de trabajo para asegurar que esto se logre.

Si la temperatura ambiente está cerca o es mayor que la de la incubadora, es necesario disponer de un sistema de enfriamiento para la cámara.

Las paredes de la incubadora deben protegerse de la luz solar.

De ser posible, las incubadoras no deben llenarse completamente en una sola operación, debido a que a los medios de cultivo les tomará mucho tiempo para equilibrar la temperatura, independientemente del tipo de incubadora que se emplee (convección de aire forzado o diferente). Evite tener las puertas de la incubadora abiertas por largos periodos.

Cuando se cargan las incubadoras, se debe prestar atención a la circulación del aire (ver 10.2.4).

5.8.3 Limpieza e higienización

Limpie e higienice regularmente las paredes interiores y exteriores de la incubadora y, si es apropiado, elimine el polvo del sistema de ventilación.

5.8.4 Verificación

Controle la estabilidad y la homogeneidad de la distribución de la temperatura a la(s) temperatura(s) de trabajo dentro del volumen de trabajo de la incubadora utilizando simultáneamente un número de termómetros o termopares de precisión conocida y con rango de temperatura apropiado.

Use la información para definir el rango de operación aceptable de la incubadora y la posición óptima del termómetro usado para monitorear las temperaturas de trabajo.

Por ejemplo, para alcanzar una temperatura deseada de $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ cuando los datos del perfil muestran un rango de $36,8\text{ °C}$ a $37,3\text{ °C}$ a través de la incubadora, entonces el rango de operación debe reducirse a $36,2\text{ °C}$ a $37,7\text{ °C}$ para garantizar que todas las partes de la incubadora alcancen la temperatura fijada de 37 °C .

Este proceso debe repetirse después de cada reparación o modificación significativa.

La temperatura de operación debe ser chequeada, por ejemplo, con uno o más termómetros de temperaturas máximas y mínimas o con termopares de registro.

El termómetro o el termopar de registro usado para el monitoreo de rutina en la incubadora se fijará en una posición definida a partir de los datos del perfil para lograr la temperatura deseada.

Controle la temperatura de la incubadora al menos cada día de trabajo. Para este propósito, cada incubadora deberá tener incorporado al menos un instrumento de medición, el cual puede tener el bulbo sumergido en glicerol (u otro líquido apropiado) contenido en un frasco cerrado.

Pueden utilizarse otros sistemas de chequeo que tengan un comportamiento equivalente.

5.9 Refrigerador y cámara fría

5.9.1 Descripción

Estas son cámaras que permiten mantener el almacenamiento en frío. Para la conservación de muestras de alimentos para análisis, la temperatura será de $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (error máximo permisible), excepto para aplicaciones particulares. Para otros usos, a menos que se especifique otra cosa, la temperatura será de $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

5.9.2 Uso

Para evitar la contaminación cruzada, use diferentes cámaras, o al menos diferentes contenedores, para lograr la separación física, para el almacenamiento de:

- medios de cultivos sin inocular y reactivos,
- muestras de ensayos, y
- cultivo de microorganismos y medio de cultivos inoculados.

Cargue los refrigeradores, heladeras y cámaras frías de forma tal que se mantenga una adecuada circulación del aire y se minimice el potencial para que ocurra contaminación cruzada.

5.9.3 Verificación

Controle la temperatura de cada cámara cada día de trabajo usando un termómetro o una sonda de forma permanente. La precisión requerida de un dispositivo de monitoreo de temperatura depende del propósito para el cual la unidad es usada.

5.9.4 Mantenimiento y limpieza

Lleve a cabo las siguientes operaciones de mantenimiento en intervalos regulares para garantizar una adecuada operación:

- eliminación del polvo de las cuchillas o de las placas externas de intercambiador térmico;
- descongelación;
- limpieza e higienización de la parte interna de las cámaras.

5.10 Congeladores y ultra-congeladores

5.10.1 Descripción

Un congelador es una cámara la cual permite garantizar el almacenamiento en congelación. La temperatura, a menos que se especifique otra cosa, estará por debajo de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, preferiblemente por debajo de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ para muestras de alimentos.

Un ultra-congelador es una cámara la cual permite garantizar el almacenamiento en congelación profunda. La temperatura, a menos que se especifique otra cosa, estará por debajo de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.10.2 Uso

5.10.2.1 Congelador

Cámaras diferentes o al menos diferentes contenedores, deberán ser habilitados para garantizar la separación física para el almacenamiento de:

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

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

5.10.2.2 Ultra-congelador

El uso principal es la conservación de microorganismos, cultivos de referencia y/o de trabajo, y reactivos.

Cargue el congelador de forma tal que se mantenga una temperatura suficientemente baja, y prevenga la contaminación cruzada entre microorganismos y reactivos.

5.10.3 Verificación

Controle regularmente la temperatura de cada cámara usando un dispositivo de monitoreo de temperatura apropiado.

5.10.4 Mantenimiento

Lleve a cabo regularmente las siguientes operaciones de mantenimiento:

- eliminación del polvo de las cuchillas o de las placas externas de intercambiador térmico; (si está accesible);
- descongelación;
- limpieza e higienización del interior de las cámaras.

5.11 Baño controlado termostáticamente

5.11.1 Descripción

Un baño controlado termostáticamente, lleno con un líquido (agua, etilen glicol, etc.), con o sin una tapa para limitar la evaporación, se requiere para mantener una temperatura en específico. El control de la temperatura es a menudo más preciso que el de una incubadora, con errores máximos permisibles de $\pm 0,5$ °C o mejor para ser alcanzados. Las temperaturas de trabajo y los errores máximos permisibles se estipulan en cada aplicación o método individual. Es necesario un sistema de enfriamiento para mantener una temperatura cercana o por debajo de la temperatura ambiente.

5.11.2 Uso

Los principales usos son los siguientes:

- Incubación de los medios de cultivo inoculados a una temperatura constante;
- Mantenimiento de los medios de cultivos estériles fundidos durante la preparación de los mismos;
- Mantenimiento a una temperatura adecuada un medio de cultivo estéril fundido para su uso en métodos específicos;
- Preparación de las suspensiones iniciales de la muestra o soluciones a una temperatura controlada;

- Tratamiento térmico de las suspensiones iniciales de la muestra a una temperatura controlada (ejemplo: pasteurización).

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

Los baños con tapas son preferibles por su precisión y cuando se requieren altas temperaturas. Deben usarse tapas con declive que permite que drene la condensación.

Para la incubación de medios inoculados, mantenga el nivel del líquido tal que el tope del medio de cultivo esté al menos 2cm por debajo del nivel del líquido en todo el baño durante la incubación.

Otros frascos pueden ser colocados dentro de los baños de forma que el nivel de su contenido esté más bajo que el nivel del líquido.

La profundidad de la inmersión deberá evitar la entrada del agua por la boca del frasco.

Pueden ser requeridos dispositivos para mantener la estabilidad de los frascos, como por ejemplo, gradillas.

Todos los frascos deben secarse, después de sacarlos del baño y antes de su uso.

5.11.3 Verificación

Controle la estabilidad y homogeneidad de la temperatura del baño antes de iniciar su uso y después de cualquier reparación o modificación que tengan un efecto en el control de la temperatura.

Monitoree cada baño con un termómetro, termopar o dispositivo de registro de temperatura de apropiada medición mínima de la incertidumbre (ver 5.28.2), que sea independiente del sistema de regulación de temperatura automática.

También puede usarse una pantalla digital, siempre que su exactitud y resolución sean verificadas.

Monitoree la temperatura del baño durante cada uso y al menos una vez al día por el periodo que se extienda la incubación

5.11.4 Mantenimiento

Los baños deben llenarse con un líquido atendiendo a las recomendaciones del fabricante. Para la incubación de los cultivos, debe usarse preferiblemente, agua destilada o desionizada.

Controle regularmente el nivel del líquido para garantizar el correcto funcionamiento del baño y una inmersión satisfactoria de los frascos en el mismo. El nivel del líquido deberá cubrir siempre los elementos que se calientan.

Los baños deben vaciarse, limpiarse, higienizarse y rellenarse regularmente y con una frecuencia en dependencia de su uso, o después que ocurra un derrame.

5.12 Vaporizadores, incluyendo los baños de agua hirviendo

5.12.1 Descripción

Los vaporizadores y los baños de agua hirviendo están constituidos por un elemento de calentamiento rodeado de agua en un recipiente con tapa adecuada que cierra. En un vaporizador, se produce vapor a presión atmosférica; en un baño de agua hirviendo, se calienta el agua a la temperatura de ebullición o a una cercana a esta, con o sin producción de vapor.

5.12.2 Uso

Los principales usos son los siguientes:

- fundir medios de cultivos;
- preparación de medios termolábiles;
- reducción de la contaminación de pequeñas misceláneas reutilizables.

En el recipiente deberá mantenerse un nivel de agua adecuado y seguro para garantizar que los elementos que se calientan estén cubiertos todo el tiempo.

Una autoclave con un sistema de evaporación-libre puede usarse también.

5.12.3 Mantenimiento

Mantenga limpios los vaporizadores y los baños de agua hirviendo.

Si es necesario, debe ejecutarse la desincrustación regular cuya frecuencia depende de la dureza del agua local.

5.13 Horno de esterilización

5.13.1 Descripción

Un horno de esterilización es una cámara que es capaz de mantener una temperatura de 160 °C a 180 °C para la destrucción de microorganismos por calor seco.

5.13.2 Uso

En el horno de esterilización, solamente se esterilizarán los equipos de metal o cristal; no se usa para artículos de plástico y goma.

Antes de la esterilización, limpie todo el material de vidrio y metal que va a esterilizarse en el horno.

Si los volumétricos de cristal se esterilizan en el horno de esterilización, verifique regularmente la exactitud del volumen marcado.

La temperatura deberá ser uniforme en toda la cámara. El horno deberá estar equipado por con un termóstato y un termómetro o dispositivo de registro de temperatura de precisión apropiada.

Debe estar equipado con indicador de duración, programador o cronómetro.

Una vez que se alcanza la temperatura de operación, la esterilización procederá en un tiempo no menor de 1 h a 170 °C o una combinación equivalente de tiempo/ temperatura.

Después de la esterilización, para prevenir roturas, debe permitirse que la cristalería se enfríe antes de extraerla del horno.

5.13.3 Verificación

Controle la estabilidad y homogeneidad de la temperatura de todo el horno antes de iniciar su uso, y después de cualquier reparación o modificación, la cual podría tener un efecto en el control de la temperatura.

El horno deberá contar con un termómetro calibrado, termopar o dispositivo de registro de temperatura de precisión apropiada, independiente del sistema automático de regulación de la temperatura. El dispositivo de monitoreo deberá tener una resolución de 1°C o mejor que la temperatura de uso del horno.

La temperatura del horno debe monitorearse y registrarse durante cada uso.

5.13.4 Mantenimiento

Limpie las superficies internas cuando se requiera.

5.14 Horno microondas

5.14.1 Descripción

Un horno microondas es un equipo que mantiene el calor de artículos usando energía de microondas a presión atmosférica.

5.14.2 Uso

Use el equipo comúnmente disponible solamente para calentar líquidos o para fundir medios de cultivos.

ADVERTENCIA – No caliente medios que contengan componentes sensibles al calor en un horno de microondas a menos que se haya verificado que este tipo de calentamiento no tiene efecto sobre el funcionamiento adecuado del medio. Aún no se ha evaluado la eficiencia del horno de microonda para esterilizar medios de cultivo, estos no deberán ser usados para este propósito.

El horno deberá ser capaz de calentar líquidos y medios de cultivos de forma controlada a través de un ciclo de emisión de microonda. La distribución de las microondas deberá ser homogénea para evitar zonas de sobrecalentamiento. Los hornos deben contar con un plato giratorio o un agitador para que las microondas den una mejor distribución del calor.

No use equipos de metal, incluyendo cierres de metal. Afloje las tapas o tapones de los frascos antes del calentamiento.

El calentamiento por periodos largos en un rango menor de potencia puede brindar una mejor distribución del calor.

ADVERTENCIA – Manipule con cuidado los artículos calentados. Los contenidos pueden comenzar a calentarse demasiado y pueden derramarse o explotar los frascos.

Cuando los medios de cultivo sólidos se funden, se recomienda, fijar una posición de bajo potencia (por ejemplo, ciclo de descongelación) y sumergir el frasco del medio en agua caliente (por ejemplo, en 50 ml a 100 ml de agua en un beaker resistente a microondas), para el control auxiliar del proceso de calentamiento.

Se recomienda esperar al menos 5 min. después del proceso de calentamiento antes de sacar el material del horno de microondas.

5.14.3 Verificación

El tiempo de calentamiento y la potencia apropiados deberán establecerse al iniciar el servicio para los diferentes volúmenes de líquidos y medios de cultivos manipulados rutinariamente, para garantizar la ejecución óptima y evitar el sobrecalentamiento de productos sensibles.

5.14.4 Mantenimiento

Limpie el horno inmediatamente cuando ocurra cualquier derrame, así como en intervalos regulares en dependencia del uso.

Los sellos de las puertas de los hornos deben inspeccionarse a intervalos regulares para ver si mantienen su integridad y el horno debe ser chequeado para verificar si hay escape de radiación.

5.15 Fregadora de cristalería

5.15.1 Descripción

Las fregadoras de cristalería de laboratorio son máquinas controladas electrónicamente para el lavado general de la cristalería del laboratorio, las cuales pueden ser programadas para diferentes ciclos de lavados y enjuagues (por ejemplo: agua destilada o desionizada o ácido).

Los dispositivos para el lavado de las pipetas de vidrio son lavadores de vidrio especiales designados para limpiar las partes estrechas de las pipetas.

5.15.2 Uso

Diferentes tipos de fregadoras de cristalería están disponibles, y estas generalmente deberán ser instaladas y usadas siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.15.3 Verificación

Controle por inspección visual la efectividad del lavado y, en aplicaciones críticas, lleve a cabo ensayos para garantizar que la cristalería esté libre de sustancias inhibitorias.

Los residuos alcalinos y ácidos pueden chequearse empleando una solución indicadora de pH; tiene que alcanzarse un rango de pH de 6,5 a 7,3.

5.15.4 Mantenimiento

Programa el mantenimiento regular según las especificaciones del fabricante con una frecuencia apropiada.

Una frecuencia mayor de servicio puede ser requerida cuando se utiliza un equipamiento pesado o en áreas de agua dura.

5.16 Microscopio óptico

5.16.1 Descripción

Existen algunos tipos diferentes de microscopio: monocular, binocular, con monitor visual, con una cámara o equipamiento de fluorescencia, etc., y con una fuente de luz interna o externa. Para exámenes bacteriológicos, se usan objetivos con aumento desde x10 (lentes secos) hasta x100 (lente de inmersión con resorte) para obtener un aumento mayor de x100 a x1000. El microscopio de contraste de fase es también útil para examinar “preparaciones húmedas”.

5.16.2 Uso

Manipule el sistema óptico del microscopio de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El eje óptico de la luz de los bombillos de alta intensidad deberá pasar a través del centro del condensador, de la platina y de los lentes objetivos hacia los lentes oculares para que no ocurran aberraciones cromáticas y esféricas.

5.16.3 Mantenimiento

Siga las instrucciones del fabricante concernientes al almacenamiento, la limpieza y el mantenimiento. Prevenga la condensación en los lugares donde la humedad es alta, ya que esto puede conllevar al deterioro de la calidad de los lentes.

Diariamente o después del uso, elimine el aceite de los lentes de inmersión y de las partes relacionadas con el uso de paños para la limpieza de lentes. Use un solvente recomendado por el fabricante. Regularmente elimine la grasa de las pestañas que quedan en los lentes oculares.

Los sistemas ópticos pueden dañarse fácilmente, y el mantenimiento, preferiblemente por el fabricante, es por consiguiente aconsejable.

5.17 Quemador de gas o incinerador de alambre

5.17.1 Descripción

Los quemadores de gas (Bunsen) producen una llama estrecha visible a partir del gas que proviene de una tubería o de un balón. Variando la cantidad de aire que se mezcla con el gas se controla el grado de calor que se produce.

Los incineradores de alambre utilizan gas o electricidad para lograr quemar al rojo vivo sin producir una llama, con el fin de esterilizar asas y agujas usadas en la manipulación de los cultivos.

5.17.2 Uso

Un quemador de gas se usa principalmente para esterilizar con la llama asas y agujas de metal que se llevan al rojo vivo y otras piezas pequeñas durables de los equipos.

El incinerador de alambre se usa para esterilizar asas y agujas de metal y es preferente su uso cuando se manipulan bacterias patógenas, ya que previene salpicaduras y evita el riesgo de contaminación cruzada.

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

Las técnicas asépticas se pueden lograr sin empleo de quemadores de gas, con el uso de material desechable.

En los gabinetes de seguridad, el uso de los quemadores de gas debe evitarse, porque pueden interferir, de manera inaceptable, con el flujo laminar de aire. En este caso se recomienda, el uso de equipamiento desechable estéril.

5.17.3 Mantenimiento

Limpie y desinfecte regularmente los quemadores y las cubiertas de los incineradores de alambre, particularmente si se derramó en los equipos cualquier medio cultivo.

5.18 Dispensador de medios de cultivo y reactivos**5.18.1 Descripción**

Un dispensador es un instrumento o dispositivo que se emplea para distribuir medios de cultivos y reactivos dentro de tubos, frascos o placas de Petri. El rango de estos dispositivos va desde un simple cilindro de medición, pipetas o jeringuillas manuales hasta jeringuillas automáticas y bombas peristálticas para dispositivos programables controlados electrónicamente con descarga automática variable.

5.18.2 Uso

El equipo limpio usado para dispensar medios de cultivos y reactivos que deberá estar libre de sustancias inhibitorias. Use tuberías separadas para medios selectivos para minimizar el arrastre de tales sustancias.

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

5.18.3 Verificación

La medición de la incertidumbre del instrumento o aparato deberá ser apropiada para el error máximo permisible en el volumen a dispensar, el cual rutinariamente no excederá $\pm 5\%$. El error máximo permisible en volúmenes que se miden de una dilución fluida usada para la preparación de diluciones decimales es de $\pm 2\%$.

Controle el volumen dispensado antes del uso inicial, y regularmente de acuerdo con un programa documentado y siempre después de cualquier ajuste efectuado al volumen dispensado.

5.18.4 Limpieza y mantenimiento

Limpie la superficie externa del dispensador después de cada uso. Lave y enjuague vigorosamente todas las partes del dispensador que entran en contacto con el producto, y esterilice este si se requiere para su empleo para dispensar líquido estéril. No use desinfectantes en las superficies que se ponen en contacto con el producto que se va a dispensar, pues ellos pueden tener propiedades inhibitorias.

Todos los dispensadores automáticos deberán ser mantenidos en buenas condiciones con un mantenimiento regular de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.19 Agitador de vórtice

5.19.1 Descripción

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

La mezcla se logra por un movimiento rotacional excéntrico de los contenidos del tubo o frasco (produciendo un vórtice).

5.19.2 Uso

Presione la base del tubo o frasco que contiene el líquido para ser mezclado contra la parte superior de la mezcladora. La velocidad de mezclado se controla por variación de la velocidad del motor o del ángulo de contacto con la parte superior de la mezcladora.

El operario debe garantizar que no ocurran derrames durante el mezclado ajustando la velocidad como sea necesario, y sosteniendo el tubo aproximadamente un tercio de su longitud por debajo del tope, para ser capaz de controlar mejor el tubo y por lo tanto evitar que el líquido suba demasiado en el mismo.

Deben tomarse precauciones apropiadas para minimizar la liberación de aerosoles cuando se abran los contenedores agitados.

5.19.3 Verificación

La mezcla adecuada se evidencia por la aparición de un remolino por todo el fondo del líquido durante la operación de mezclado.

5.19.4 Mantenimiento

Mantenga el equipo limpio. Si ocurren derrames, descontamine el equipo usando un desinfectante de laboratorio apropiado.

5.20 Contador de colonias

5.20.1 Descripción

El contador manual de colonias usa un dispositivo para contar que funciona por presión, y usualmente produce un sonido que indica cada conteo realizado, y un lector digital externo de todo el conteo. Ellos pueden ser simples dispositivos tipo bolígrafo o pueden consistir de un escenario

iluminado con una rejilla calibrada por la placa y una lupa para auxiliar la detección de las colonias. Los contadores electrónicos automáticos de colonias, incorporan analizadores de imágenes, operan por 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 todas las colonias objeto de estudio se cuenten. Los contadores de colonias automáticos electrónicos también requieren programas separados cuando se usan con diferentes tipos de agar y de matrices, y para conteos de superficie y para conteos de placas vertidas, con el fin de garantizar una discriminación adecuada de las colonias objeto de estudio.

5.20.3 Verificación

El chequeo debe hacerse manualmente de forma regular para garantizar que se obtienen conteos precisos usando un contador de colonias.

Además, los contadores automáticos de colonias deben chequearse todos los días de uso con una placa de calibración que contenga un número conocido de partículas contables o colonias.

5.20.4 Limpieza y mantenimiento

Mantenga el equipo limpio y sin polvo; evite rayones de las superficies que son un elemento esencial del proceso de conteo. Programe el mantenimiento regular de los contadores electrónicos con analizadores de imágenes incorporados, según las especificaciones del fabricante, con una frecuencia apropiada.

5.21 Equipo para cultivo en una atmósfera modificada

5.21.1 Descripción

Este puede ser una jarra que puede cerrarse herméticamente o cualquier otro equipamiento adecuado que permita que se mantengan condiciones atmosféricas modificadas (por ejemplo: para anaerobiosis) durante el tiempo de incubación total de un medio de cultivo. Pueden emplearse otros sistemas de comportamiento equivalente, tales como los gabinetes de anaerobiosis.

Para su instalación y mantenimiento siga las instrucciones del fabricante.

5.21.2 Uso

La composición de la atmósfera requerida puede lograrse mediante la adición de una mezcla de gases (por ejemplo: desde un cilindro de gas) con la posterior evacuación del aire de la jarra, por el cambio de la atmósfera en un gabinete o por otro medio apropiado (tales como los sobres de gas comercialmente disponibles).

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

Las condiciones pueden necesitar modificaciones dependiendo de los requerimientos de los microorganismos específicos.

5.21.3 Verificación

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

5.21.4 Mantenimiento

Si se pone un catalizador, regenérelo regularmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Si se ponen válvulas, limpie y lubrique estas para garantizar el funcionamiento apropiado y reemplácelas si es necesario.

Limpie e higienice el equipo regularmente.

5.22 Centrífuga

5.22.1 Descripción

Las centrifugas son dispositivos operados mecánica o electrónicamente que usan la fuerza centrífuga para separar partículas suspendidas, incluyendo microorganismos, desde fluidos.

5.22.2 Uso

En algunas aplicaciones, se logra la concentración de microorganismos objeto de estudio por centrifugación de muestras líquidas para lograr un precipitado, el cual puede ser resuspendido en un líquido y someterse a examen posteriormente.

Tome las precauciones necesarias para prevenir generación de aerosoles y contaminación cruzada, operando correctamente el equipo y empleando tubos o frascos de centrifuga sellados y estériles.

5.22.3 Verificación

Cuando la velocidad de centrifugación es crítica o específica en la aplicación y después de una reparación o modificación significativa., el indicador de velocidad o la configuración deben controlarse regularmente contra un tacómetro independiente calibrado.

5.22.4 Mantenimiento

Limpie y desinfecte las centrifugas regularmente y después de cualquier derrame de cultivos microbianos o de muestras potencialmente contaminadas.

Las centrifugas deben ser regularmente chequeadas.

5.23 Plancha de calentamiento y manta de calefacción

5.23.1 Descripción

Las planchas de calentamiento y mantas de calefacción son dispositivos de calentamiento controlados termostáticamente. Algunos calentadores y mantos de calefacción tienen incorporados sistema de agitación magnético.

5.23.2 Uso

Las planchas de calentamiento y mantas de calefacción equipados con sistemas de agitación magnética se usan para el calentamiento de volúmenes relativamente grandes de líquidos, como los medios de cultivo.

No use planchas de calentamiento y mantas de calefacción sin sistemas de agitación para la preparación de medios.

5.23.3 Mantenimiento

Limpie cualquier derrame tan pronto como la unidad se enfríe.

5.24 Sembrador en espiral

5.24.1 Descripción

Un sembrador en espiral es un dispensador que distribuye un volumen predeterminado de líquido sobre la superficie de una placa de medio sólido que rota. El brazo dispensador se mueve desde el centro de la placa hacia el borde exterior en una espiral de Arquímedes. El volumen dispensado se reduce con el movimiento de la aguja de dispensación desde el centro al borde de la placa, tal que existe una relación inversa entre el volumen depositado y el radio del espiral. El volumen de muestra dispensado en cualquier segmento en particular es conocido y constante. Se requiere una fuente de vacío para cargar y dispensar los líquidos.

5.24.2 Uso

El equipo se usa para dispensar una muestra líquida, una muestra homogénea o una dilución dentro de una placa con medio sólido apropiado para determinar un conteo de colonias. Después de la incubación, las colonias crecen a lo largo de las líneas donde se depositó el líquido. El número de colonias en un área conocida se cuenta usando una rejilla para conteo que posee el equipo y se calcula el conteo.

La superficie de la placa con medio sólido deberá estar nivelada y libre de burbujas de aire, para usarse con el plaqueador en espiral.

Las placas deben secarse previamente antes del uso para eliminar el exceso de humedad.

El sistema dispensador debe higienizarse y enjuagarse con agua estéril antes de cada muestra y después del uso.

5.24.3 Verificación

Controle el ángulo de la aguja diariamente usando un vacío para tener una cubierta deslizante contra la cara de la aguja. La cubierta deslizante debe estar paralela y a 1 mm de la superficie del medio.

El patrón de dispensado debe verificarse dispensando tinta lavable. El patrón del sembrador en espiral debe ser más denso cerca del centro de la placa donde comienza a añadirse el depósito y se convierte invariablemente menos denso en el punto donde la aguja se levanta. La porción clara de la placa debe ser central y de aproximadamente 2,0 cm de diámetro.

Debe llevarse a cabo un chequeo diario para asegurar que la inclinación de la aguja esté en el ángulo correcto a la superficie del agar usando la cubierta deslizante y el medidor de nivel proveído con el instrumento.

La esterilidad del sembrador en espiral debe verificarse sembrando agua estéril para cada serie de muestras examinadas.

Un chequeo gravimétrico del volumen dispensado debe realizarse regularmente usando agua destilada. La masa obtenida debe estar dentro de un error máximo permisible de $\pm 5\%$ de la masa esperada para el volumen dispensado.

5.24.4 Mantenimiento

La desinfección del tubo dispensador y la aguja puede lograrse pasando con un flujo con una solución con 0,5 % a 1 % de cloro libre. Esto deberá seguirse por un flujo de agua destilada o desionizada estéril.

Las obstrucciones pueden prevenirse permitiendo el asentamiento de cualquier partícula antes de cargar la suspensión de la muestra y usando una porción del líquido sobrenadante.

Cualquier derrame debe eliminarse inmediatamente y el equipo se debe limpiar de forma regular.

El equipo debe recibir mantenimiento y debe ser verificado según el uso.

5.25 Destiladores, desionizadores y unidades de ósmosis inversa

5.25.1 Descripción

Estos equipos se usan para producir agua destilada o desionizada/desmineralizada de calidad requerida (ver NC-ISO/TS 11133) para la preparación de medios de cultivos microbiológico o de reactivos y para otras aplicaciones del laboratorio.

5.25.2 Uso

Instale, ponga en servicio y use el equipo de acuerdo con las instrucciones del fabricante, teniendo en cuenta la posición del agua del laboratorio, los desechos y los servicios eléctricos.

5.25.3 Verificación

El agua deberá controlarse regularmente o cuando sea usada después del almacenamiento para determinar si la conductividad es satisfactoria, esta no deberá ser mayor que $25\ \mu\text{S}/\text{cm}$ (el equivalente a una resistencia de $\geq 40\ 000\ \Omega\text{-cm}$) para la preparación de medios y reactivos.

Si el agua se almacena antes del uso o se produce a través de un cambio de iones, deben ser llevados a cabo chequeos apropiados para la contaminación microbiana de acuerdo con la NC-ISO/TS 11133.

5.25.4 Mantenimiento

Los destiladores deben limpiarse y desincrustarse con una frecuencia en dependencia de la dureza del agua de entrada. Los desionizadores y las unidades de ósmosis inversa deben mantenerse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.26 Relojes automáticos y cronómetros**5.26.1 Descripción**

Los relojes y cronómetros integrales son instrumentos que permiten lapsos de tiempo correctos para ser usados en muchas aplicaciones del laboratorio donde la duración es específica y crítica.

5.26.2 Uso

Los temporizadores de mano o de mesa analógicos y digitales usados para monitorear la duración de las operaciones en el laboratorio (ejemplo, la aplicación de colorantes a frotis, homogeneización de muestras) deberán estar en buenas condiciones y ser capaces de lograr la exactitud requerida.

Opere los cronómetros integrales en los equipos de laboratorio (ejemplo, autoclaves, centrifugas, homogeneizadores) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos cronómetros deberán ser capaces de lograr la exactitud requerida.

5.26.3 Verificación

Controle todos los cronómetros usados en operaciones del laboratorio donde la duración es crítica para el resultado contra la señal del tiempo nacional, regularmente y después de reparaciones significativas.

5.26.4 Mantenimiento

Limpie y controle regularmente los cronómetros para su correcto funcionamiento.

Los cronómetros integrales deberán chequearse como parte del procedimiento de mantenimiento para el instrumento.

5.27 Pipetas y pipeteadores**5.27.1 Descripción**

Las pipetas son dispositivos de vidrio o de plástico desechable que se usan para tomar volúmenes de materiales líquidos o viscosos; las pipetas graduadas descargan volúmenes medidos con una exactitud que está en dependencia de la especificación.

Los pipeteadores automáticos (mecánicos) que usan puntas plásticas son dispositivos que dispensan volúmenes de líquidos fijos o ajustables, por la acción de un émbolo que se opera manual o eléctricamente.

5.27.2 Uso

Deseche las pipetas que están dañadas o rotas.

A las pipetas Pasteur o graduadas estériles y las puntas de los pipeteadores se les debe poner un filtro de algodón no absorbente para prevenir la contaminación cuando se manipulan cultivos microbianos.

No pipetee con la boca en instalaciones microbiológicas, excepto para líquidos no contaminados.

Las peras de goma usadas en las pipetas Pasteur o graduadas y las puntas para auxiliares de pipeteo deberán tener el tamaño correcto para prevenir el goteo y asegurar una operación eficiente.

5.27.3 Verificación

Controle las pipetas graduadas para confirmar la descarga de volúmenes correctos si el fabricante no certifica su exactitud (robustez y precisión).

La calibración de pipetas/ y auxiliares de pipeteo se describe en la ISO 835 (todas las partes) e ISO 8655-1.

Pruebe los auxiliares de pipeteo nuevos antes del uso, y a intervalos regulares en dependencia de la frecuencia y la naturaleza del uso, para confirmar que respetan los máximos errores permisibles definidos en la ISO 8655-1. Realice chequeos gravimétricos intermedios usando agua destilada o desionizada, para asegurar que los volúmenes dispensados quedan dentro de los errores máximos permisibles.

Chequear lotes nuevos de pipetas graduadas.

5.27.4 Mantenimiento

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

Si los tubos o émbolos de los pipeteadores automáticos se contaminan en el uso, desarme los mismos para su descontaminación y limpieza. Después reensamble y recalibre estos. Si no es posible realizar esta operación en el laboratorio, envíe los pipeteadores al fabricante para que lo haga.

5.28 Termómetros e instrumentos de monitoreo de temperatura, incluyendo registros automáticos

5.28.1 Descripción

Los termómetros son instrumentos de dos tipos, mercurio o alcohol, que se usan para monitorear temperaturas en todo el rango de actividades del laboratorio.

Otros dispositivos que monitorean temperatura incluyen termómetros con resistencia de platino e instrumentos que usan termopares para medir temperatura y proporcionan una lectura visual, copia dura o un registro electrónico de la variación de la temperatura en el tiempo.

Los termómetros y otros dispositivos que monitorean la temperatura de referencia se calibrarán por los patrones nacionales o internacionales y se certificarán como tal. Se usarán para propósitos de referencia solamente y no se usarán para el monitoreo de rutina.

Los termómetros y otros dispositivos que registran temperatura de trabajo se calibrarán de modo que se permitan la trazabilidad con los patrones nacionales o internacionales.

Los dispositivos de exactitud adecuada que se atañen a una especificación internacional o nacional apropiada también pueden utilizarse como termómetros de trabajo después de la verificación de su desempeño.

5.28.2 Uso

Los termómetros y otros dispositivos que monitorean temperatura serán capaces de medir la temperatura requerida por una aplicación dentro de los errores máximos permisibles especificados.

La medición de la incertidumbre del dispositivo que monitorea la temperatura debe ser cuatro veces más pequeñas que el rango del error máximo permisible demandado. Por ejemplo, para un error máximo permisible de ± 1 °C, la medición de la incertidumbre debe ser $\pm 0,25$ °C; para un error máximo permisible de $\pm 0,5$ °C, la medición de la incertidumbre debe ser $\pm 0,125$ °C. La medición de la incertidumbre de la calibración del termómetro de referencia debe ser también tomada en cuenta al determinar la temperatura de trabajo.

Los termómetros o termopares colocados dentro de incubadoras aeróbicas deben estar asegurados en frascos adecuados que contengan glicerol, parafina líquida o polipropilén glicol para amortiguar la pérdida de calor cuando se abre la puerta y ofrecer una lectura estable.

Use termómetros de inmersión total que tengan solamente el bulbo sumergido.

Los termómetros colocados en baños de agua deben estar sumergidos en el agua de acuerdo con las especificaciones individuales, ejemplo: termómetros de inmersión parcial deben sumergirse a la profundidad que se especifica para este termómetro, por ejemplo, 76 mm. ó 100 mm.

No use los termómetros si la columna de mercurio o alcohol están quebradas.

Los termómetros de mercurio son frágiles y, si hay riesgo de rotura, entonces deben colocarse dentro de protectores para termómetros que no interfieran con las mediciones de temperatura.

ADVERTENCIA — El mercurio es nocivo para la salud. Elimine los derrames de acuerdo con las regulaciones nacionales.

5.28.3 Verificación

Los termómetros de referencia se calibrarán, antes del uso inicial y al menos cada 5 años, en todo el rango contra los patrones trazables nacionales o internacionales. La calibración puntual simple intermedia (por ejemplo: el punto de hielo) se realizará para verificar el desempeño.

Los termopares de referencia se calibrarán completamente, antes del uso inicial y de acuerdo con las instrucciones de fabricante, contra los patrones trazables nacionales o internacionales. Los chequeos intermedios estarán hechos contra un termómetro de referencia para verificar desempeño.

Otros dispositivos que monitorean la temperatura (como los receptores de ondas de radio) se calibrarán contra los patrones trazables nacionales o internacionales y de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los termómetros y termopares en funciones deben chequearse en el punto de congelación y/o contra a un termómetro de referencia en funciones en el rango de la temperatura de trabajo.

5.28.4 Mantenimiento

Mantenga los termómetros y termopares limpios y en condiciones adecuadas.

Mantenga otros dispositivos que monitorean temperatura de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.29 Separador inmunomagnético

5.29.1 Descripción

Este equipo se usa para separar y concentrar microorganismos objeto de estudio en cultivos líquidos por medio de gotas paramagnéticas recubiertas con un anticuerpo apropiado.

Los separadores manuales constan de una mezcladora capaz de rotar desde 12 r/min. hasta 20 r/min. y un concentrador de partículas con una barra magnética extraíble.

Los separadores automatizados usan un sistema de peine de barras magnéticas y gradillas para tubos. Las partículas magnéticas se mueven de un tubo al otro tubo y permiten el procedimiento entero de separación, incluyen etapas de lavado, que se realizan automáticamente en un ambiente cerrado.

5.29.2 Uso y verificación

Siga las instrucciones del fabricante para el uso y aquellas dadas en las normas específicas (ejemplo: *E. coli* O157).

Para los sistemas manuales, controle la velocidad de rotación de la mezcladora.

Para los sistemas manuales y automatizados, verifique que el sistema es capaz de aislar bajos niveles del microorganismo objeto de estudio, antes de ponerlo en uso rutinario.

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

5.29.3 Mantenimiento

Inspeccione y aplique mantenimiento al equipo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.30 Sistema de filtración

El sistema de filtración usado se describe en la ISO 8199.

5.31 Otros equipos y software

Otros equipos y el software asociado a estos, serán capaces de lograr la exactitud requerida y cumplir con las especificaciones pertinentes para los ensayos concernientes. Los programas de calibración se establecerán para cantidades o valores claves donde estas propiedades tienen un efecto significativo en el resultado. Antes del uso rutinario, calibre o controle el equipamiento para establecer que se ajusta a los requerimientos del laboratorio y cumple con las especificaciones de las normas específicas. Cualquier reconfiguración o modificación hecha por el laboratorio al software se verificará para asegurar que el software modificado ofrece el resultado correcto.

6 Preparación de la cristalería y otros materiales de laboratorio

6.1 Preparación

La cristalería y otros materiales de laboratorio usados en microbiología deberán ser de un diseño apropiado, usado correctamente y preparado de manera tal que garantice su limpieza y/o esterilidad hasta el momento del uso.

Deberá diseñarse para prevenir o limitar el contacto entre el operador y el material infeccioso.

Los tubos y frascos deben taparse con los medios apropiados. Si es necesario, la cristalería a ser esterilizada (ejemplo: pipetas) debe colocarse en un contenedores especiales o envuelta en un material apropiado (papel especial, papel de aluminio, etc.). Para la cristalería que va a ser autoclaveada vacía debe permitirse el acceso libre del vapor, de lo contrario no se logrará la esterilización.

6.2 Esterilización / descontaminación

6.2.1 Generalidades

Debe registrarse la temperatura y la duración de la esterilización /descontaminación. Los indicadores de esterilización pueden usarse para distinguir entre materiales esterilizados y no esterilizados.

6.2.2 Esterilización por calor seco

Caliente la cristalería, etc., en un horno esterilizante por al menos 1 h a 170 °C o un equivalente.

6.2.3 Esterilización por calor húmedo (vapor)

El vapor húmedo bajo presión es el método más efectivo de esterilización de la cristalería y los materiales de laboratorio. La temperatura de la cámara de la autoclave se mantendrá a 121 °C por al menos 15 min. (ver 5.6).

6.2.4 Descontaminación con compuestos químicos

Use compuestos químicos (ejemplo: productos a base de cloruro, alcoholes, compuestos de amonio cuaternario) en concentraciones adecuadas y para un tiempo de contacto apropiado.

Asegure que los residuos químicos no afecten el recobrado de los microorganismos.

6.3 Equipo y materiales desechables

El equipamiento y los materiales desechables pueden usarse en lugar del equipamiento y los materiales reutilizables (cristalería, placas de Petri, pipetas, frascos, tubos, asas, espátulas, etc.) si las especificaciones son similares.

Es aconsejable verificar que tal equipamiento es adecuado para uso en microbiología (en particular en relación a su esterilidad) y que el material no contiene sustancias que inhiban el crecimiento de los microorganismos (ver ISO 9998).

6.3 Almacenamiento de cristalería limpia y materiales

Proteja la cristalería y los materiales limpios del polvo durante el almacenamiento, en condiciones en las cuales mantenga su limpieza.

6.5 Manejo de cristalería estéril y materiales

Almacene la cristalería y los materiales bajo condiciones tales que aseguren que se mantengan estériles. Almacene el equipo de simple-uso de acuerdo a las instrucciones del fabricante, sin ningún deterioro del empaque. Almacene el equipo preparado en el laboratorio en condiciones limpias.

Cuando el equipo estéril es para uso microbiológico, ponga la fecha de expiración (o la fecha de producción) en cada paquete.

6.6 Utilización de la descontaminación y desinfección

6.6.1 Descontaminación del equipo desechable

Descontamine el equipo desechable antes de ser eliminado.

Además de los métodos descritos en esta cláusula, puede usarse la incineración. Si la instalación cuenta con un incinerador, la descontaminación y el desecho puede llevarse a cabo como una operación simple.

6.6.2 Descontaminación de la cristalería y los materiales antes del uso

En general, la esterilización del equipamiento debe hacerse con calor húmedo (ver 6.2.3) o calor seco (ver 6.2.2).

En determinadas situaciones (ejemplo: muestreo de campo), la descontaminación química puede ser apropiada. Después de este tratamiento, el equipo debe estar libre de sustancias inhibitorias.

6.6.3 Descontaminación de la cristalería y los materiales después del uso

Los materiales para la descontaminación y el desecho deben colocarse en contenedores, ejemplo, bolsas plásticas autoclaveables. El uso de autoclave es el mejor método para todo proceso de descontaminación (al menos 30 min. a 121 °C). El autoclave debe cargarse de modo que favorezca la penetración del calor dentro de la carga, (ejemplo: sin sobre-empaque) y teniendo el cuidado de aflojar las retapas/tapas y de abrir las bolsas.

Otros métodos alternativos, además de la esterilización en autoclave, pueden usarse si se permiten por las regulaciones nacionales.

Esterilice en autoclave todo el equipamiento que estuvo en contacto con cultivos microbianos (medios de cultivos sólidos o líquidos), incluyendo contenedores reutilizables, previo al fregado.

Durante el ensayo, puede usarse la descontaminación por inmersión en dilución desinfectante de uso recién preparada para el equipamiento de pequeño tamaño y resistente a la corrosión (ejemplo: pipetas).

Use las pipetas Pasteur solo una vez.

Los principales desinfectantes (ver Anexo A) tienen algunos efectos tóxicos. Use guantes y protectores para los ojos cuando manipule desinfectantes concentrados.

6.7 Manejo de los desechos

La correcta eliminación de materiales contaminados no afecta directamente la calidad de la muestra de análisis, sin embargo concierne al buen manejo del laboratorio.

Esto debería ajustarse a las regulaciones nacionales ambientales o de seguridad y salud.

Debería establecerse un sistema para la identificación y separación de materiales contaminados y sus contenedores para:

- desechos no contaminados (ejemplo: muestras de alimentos no contaminadas) que pueden verterse con los desechos generales,
- escalpelos, punzones, cuchillos, abridores,
- material contaminado para esterilizar en autoclave y recircular, y
- material contaminado para esterilizar en autoclave y desechar, o para desechar solamente si el material es para ser incinerado (ver debajo, sin embargo, los requerimientos especiales para microorganismo de categoría de riesgo 3).

La incineración de materiales contaminados y sus contenedores debe llevarse a cabo de acuerdo con las regulaciones nacionales ambientales o de seguridad y salud.

Los materiales contaminados con microorganismo de categoría de riesgo 3 y sus contenedores deben esterilizarse en autoclave antes de ser incinerados.

6.8 Fregado

Friegue el equipo reutilizable solamente después de que este sea descontaminado. Después de fregarlo, enjuague todo el equipo con agua desionizada.

El equipamiento especializado puede ser usado para facilitar las operaciones de limpieza (ejemplo: lavador de pipetas, lavador de placas, baño ultrasónico).

Después del fregado, el equipamiento reutilizable debe estar libre de residuos que puedan afectar el crecimiento subsiguiente de los microorganismos.

7 Preparación y esterilización de medios de cultivo y reactivos

Prepare y esterilice los medios de cultivo de acuerdo con la NC-ISO 11133-1 y la NC-ISO11133-2.

8 Muestras de laboratorio

8.1 Muestreo

8.1.1 Generalidades

Aunque es extremadamente importante para la interpretación de los resultados, el muestreo y los planes de muestreo no son parte de esta Norma Cubana. Es importante que el laboratorio reciba una muestra que sea representativa del lote del producto y que no haya sido dañada o cambiada durante la transportación o el almacenamiento.

La muestra deberá protegerse de contaminación externa por el aire, el frasco de la muestra, los instrumentos de muestreo que se empleen y la inadecuada manipulación. Un frasco de muestra no deberá llenarse más de tres cuartos para evitar derrame y para permitir la mezcla correcta de la muestra en el laboratorio.

Identifique las muestras clara y completamente, y registre la información de la muestra.

Frecuentemente, la temperatura al momento de recoger la muestra y la temperatura a la cual se recibe son útiles al laboratorio para la interpretación de los resultados.

La muestra debería enviarse en su recipiente original, sin abrir.

Si el producto es voluminoso o el envase es demasiado grande para ser admitido por el laboratorio, transferir asépticamente una porción de la muestra a un frasco estéril.

El frasco estéril para la muestra debe abrirse solo lo justo para permitir que la misma sea transferida a él y después de esto debe cerrarse inmediatamente.

8.1.2 Plan de muestreo

El muestreo no es parte de esta norma. Vea la norma específica relacionada con el producto en cuestión, si existe.

8.2 Transporte

El modo de transportación de las muestras hacia el laboratorio deberá asegurar que estas se mantengan bajo condiciones que minimicen cualquier alteración en el número de microorganismos presentes.

Entregue las muestras al laboratorio rápidamente manteniendo tanto como sean posibles las condiciones de almacenamiento originales.

La muestra debe empacarse de tal forma que se eviten derrames o rajaduras.

La etiqueta del producto debe indicar si se requiere refrigeración.

Las muestras que no requieren refrigeración o congelación pueden empacarse en un envase usando un material de empaque apropiado para evitar roturas.

No use hielo suelto ya que esto puede causar la contaminación del producto si el frasco se rompe o se raja.

A menos que se establezca otra cosa en normas específicas (ejemplo: ISO 6887 e ISO 8261), las siguientes temperaturas se recomiendan durante el transporte:

- productos estables: temperatura ambiente (por debajo de 40 °C);
- productos congelados o muy congelados: por debajo de — 15 °C, preferiblemente por debajo de — 18 °C;
- otros productos no estables a temperatura ambiente: 1 °C a 8 °C;
- muestras de hisopajes: Vea la ISO 18593 y la ISO 17604

Cuando las condiciones no se especifiquen, se recomienda que las partes concernientes se pongan de acuerdo en la duración y la temperatura de transportación.

8.3 Recepción

Verifique el estado de las muestras a su arribo.

Si el estado de las mismas no es satisfactorio o si las muestras son insuficientes, el laboratorio deberá rechazar las muestras.

En circunstancias especiales, las muestras pueden analizarse, después de discusión y acuerdo con el cliente.

Sin embargo, el informe de la prueba incluirá las reservas sobre la validez de los resultados.

Documente las muestras admitidas en el laboratorio tal que pueda monitorearse el progreso de las mismas hasta el momento de redactar el informe del ensayo. La identidad y código de las muestras y los registros deberá asegurar la trazabilidad a través de todas las estadías en el laboratorio.

Si es necesario, las superficies exteriores de los envases deben ser desinfectados utilizando el desinfectante apropiado.

Verifique los envases de muestras para detectar defectos físicos evidentes.

Anote la siguiente información:

- fecha (y hora, si es aplicable) de recepción;
- detalles del muestreo (fecha y hora del muestreo, si es aplicable y se conoce, estado de la muestra);

- nombre y dirección del cliente.

En el recibo de muestras perecederas, registre la temperatura de transporte o la temperatura de una muestra simulada incluida para este propósito.

Examine las muestras tan pronto como sea posible después de recibirlas, preferiblemente dentro de las 24 h de muestreo.

Para productos perecederos (tales como pescado, leche cruda), el ensayo debe comenzar dentro de las 36 horas.

Si los plazos mencionados arriba no pueden ser respetados, las muestras pueden congelarse por debajo de -15 °C , preferiblemente a -18 °C , asegúrese que ha sido demostrado que el recobrado del (o de los) microorganismo(s) objeto de estudio no son disminuidos significativamente con la matriz de la muestra en particular.

8.4 Almacenamiento

Almacene las muestras que esperan para ser examinadas bajo condiciones las cuales minimizarán cualquier alteración en el número de microorganismos presentes.

Se recomiendan las siguientes temperaturas de conservación:

- productos estables: temperatura ambiente (18 °C a 27 °C)
- productos congelados o muy congelados: por debajo de -15 °C , preferiblemente por debajo de -18 °C ;
- otros productos no estables a temperatura ambiente, incluyendo alimentos deteriorados: $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (vea ISO 6887-2 a ISO 6887-4 ó ISO 8261);
- muestras de hisopajes: Vea la ISO 18593 y la ISO 17604

8.5 Porción de ensayo

8.5.1 Reglas específicas para la toma de las porciones de ensayo

Refiérase a la parte aplicable de la ISO 6887, o de la ISO 8261, para las reglas específicas sobre la toma de la porción de ensayo, la homogenización de la muestra y la suspensión inicial.

8.5.2 Conservación y destrucción de las muestras de laboratorio

Excepto en casos especiales, mantenga las muestras del laboratorio hasta que se hayan obtenido todos los resultados, o por más tiempo si es necesario, empáquelas en recipientes estériles (por ejemplo, bolsas plásticas) y manténgalas en su temperatura de conservación original.

Los productos perecederos deben ser congelados.

NOTA Esta no es una práctica normalmente aceptada para retener las muestras, debido a posibles cambios en el estatus microbiológico.

9 Examen

9.1 Precauciones higiénicas durante el análisis

Evite la contaminación del ambiente y de las porciones de ensayo, manipule productos en polvo (deshidratados) en un cuarto o área separada o en una cabina protectora.

Previo a abrir muestras ordinarias, hisope el área alrededor del punto destinado a la apertura con alcohol al 70 % (por volumen) (u otro producto equivalente) y espere a que se evapore. Antes de abrir paquetes estériles, sumerja el área por donde se va a abrir en una solución que contenga 100 ppm a 200 ppm de cloro libre (u otro esterilizante disponible), por al menos 10 min., para destruir microorganismos que podrían contaminar la muestra.

Cualquier instrumento que sea usado para abrir el empaque y extraer todo o parte de la muestra (abridor, tijeras, cuchara, pinzas, pipeta, etc.) deberá ser estéril.

El área de trabajo circundante debe limpiarse e hisoparse con un desinfectante apropiado antes del comienzo del ensayo.

Las manos deben lavarse inmediatamente antes de comenzar el ensayo y otra vez durante el ensayo si las mismas se contaminan.

Todos los instrumentos usados deben estar esterilizados y protegidos de la exposición a la contaminación antes y durante el uso.

Todos los instrumentos y utensilios usados deben colocarse en un contenedor adecuado para su subsiguiente desecho o esterilización.

Tome precauciones tales que el trabajo se realice, tanto como sea posible, bajo condiciones asépticas. Por ejemplo:

- a) asegúrese de que el área de trabajo esté limpia, y que todas las posibles fuentes de contaminación se han eliminado o reducido al mínimo y que no hayan corrientes de aire (o sea, que las puertas y ventanas están cerradas), y evite movimiento de personal innecesario durante el examen;
- b) antes y después de terminar el trabajo, descontamine la superficie de trabajo con desinfectante apropiado;
- c) asegúrese, antes de comenzar, que dispone de todo lo requerido para realizar el trabajo (y sólo esto) está disponible;
- d) realice el trabajo sin dilatación;
- e) separe las actividades "limpias" y "sucias" por tiempo o ubicación (esto es particularmente importante con muestras de alto riesgo, tales como carne y huevos crudos);
- f) utilice equipamiento desechable;

- g) si durante el curso de un examen no se utiliza todo el contenido de una bolsa de pipetas desechables, placas de Petri, etc. asegúrese que el envase quede debidamente cerrado después de tomar la cantidad apropiada de unidades;
- h) absorba inmediatamente cualquier derrame empleando almohadillas de algodón o cualquier otro material apropiado impregnado con alcohol al 70 % (por volumen) o cualquier otro desinfectante apropiado¹, entonces limpie y desinfecte la superficie de trabajo antes de continuar;
- i) use una cabina de seguridad para la manipulación de productos que contengan probablemente bacterias patógenas, si es requerido por las regulaciones nacionales;
- j) cuando extraiga una pipeta estéril para un caso, no permita que la punta toque las superficies exteriores del contenedor de pipetas ya que tales superficies están sujetas a contaminación;
- k) no permita que la pipeta toque las bocas o cuellos de los frascos de dilución;

Los aerosoles son una causa principal de contaminación ambiental y de infección. Los aerosoles pueden formarse por ejemplo:

- Al abrir las placas Petri, tubos y frascos;
- Al utilizar agitadores, jeringas, centrifugas, etc.;
- Al vaciar las pipetas;
- Al esterilizar agujas o asas de inoculación húmedas;
- Al abrir ámpulas que contienen cultivos liofilizados.

Por lo tanto, es necesario evitar su formación.

Para los métodos moleculares, tome precauciones adicionales de acuerdo con la ISO 22174.

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 aplicable de la ISO 6887, ó la ISO 8261. El tiempo transcurrido desde el final de la preparación de la suspensión inicial hasta el momento en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no deberá exceder los 45 min, a no ser que esté mencionado específicamente en la Norma Cubana pertinente.

Los pasos para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones, podrían seguir un paso de enriquecimiento como se describe en normas específicas.

¹ Cuando se usan otros desinfectantes diferentes de alcohol al 70 % (por volumen), se necesita para una desinfección efectiva, tiempos de contacto apropiados, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

9.2.2 Concentración

9.2.2.1 Centrifugación o filtración por membrana

Si se requiere la enumeración de números bajos de microorganismos, la enumeración podría mejorarse, tanto en términos de sensibilidad como de precisión, con la introducción de un paso de concentración de la porción de ensayo. Esta concentración puede lograrse por centrifugación o por filtración por membrana.

Si se usa centrifugación, resuspenda el sedimento centrifugado en un volumen conocido de diluyente y continúe el análisis.

Para cada combinación considerada (alimento más microorganismo), deberá llevarse a cabo un estudio (vea por ejemplo la referencia [23] en la bibliografía) para demostrar si la adición de un paso de concentración es necesario y válido. La posibilidad de que la suspensión de alimentos sea filtrable deberá evaluarse.

La ejecución de todo el método, en términos de sensibilidad, selectividad, linealidad y repetibilidad, debe ser verificada. Si el nivel de contaminación es desconocido, debe conducirse en paralelo el método normado (sin filtración).

9.2.2.2 Inmunoseparación

Si en la muestra están presentes números bajos de microorganismos objeto de estudio, la separación y concentración de microorganismos podría lograrse con perlas inmunomagnéticas cubiertas con anticuerpos específicos.

Propague las perlas, junto con los microorganismos objeto de estudios capturados, directamente en un medio sólido específico de acuerdo con las normas específicas. No obstante, verifique que las perlas inmunomagnéticas cubiertas con anticuerpos específicos utilizadas para este paso de concentración son las adecuadas, según lo demostrado en estudios de evaluación publicados en la literatura científica internacional, preferiblemente relacionada con la microbiología de alimentos. Esta verificación es especialmente importante si este procedimiento no ha sido validado de acuerdo con la ISO 16140.

10 Enumeración

10.1 Generalidades

Los ensayos de calidad y/o seguridad microbiológica de los alimentos de consumo humano y animal, a menudo no son suficientes para conocer cuáles microorganismos están presentes. En la mayoría de los casos, el aspecto cuantitativo es igualmente importante, lo cual demuestra la necesidad de enumerar microorganismos. Esto puede lograrse por varias vías: a través de examen directo (microscopía), por inoculación en medio sólido o líquido, con citometría de flujo, por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, etc. Sin embargo, esta norma solamente cubrirá la enumeración usando medio sólido y líquido.

La enumeración en medio sólido se basa en la capacidad de muchos microorganismos para producir colonias dentro o sobre el medio con agar, que pueden ser reconocidas a simple vista o con la ayuda de un simple cristal de aumento. No obstante, si la matriz contiene muchas partículas que pueden interferir con la detección de las colonias, o si el tenor de las bacterias es muy bajo,

este principio no puede usarse sin previamente separar los microorganismos objeto de estudio de la matriz (por ejemplo: por filtración o inmunoseparación). En tales casos, es una alternativa aceptable a menudo la enumeración en un medio líquido.

10.2 Enumeración empleando un medio sólido

10.2.1 Generalidades

La placa de Petri debe ser marcada con el número de muestra, la dilución, la fecha y cualquier otra información deseada.

Las diluciones deben seleccionarse para asegurar que se obtengan las placas que contengan el número apropiado de colonias (vea 10.3.1) y sobreponerse a cualquier propiedad inhibitoria posible.

Utilice una pipeta estéril por separado para transferir de cada dilución, excepto si está trabajando de mayor a menor dilución.

10.2.2 Número de placas de Petri por dilución

Para las técnicas de enumeración en microbiología de los alimentos, debe usarse una placa por dilución con al menos dos diluciones sucesivas, para laboratorios que trabajan bajo aseguramiento de la calidad acorde con los principios de la NC-ISO/IEC 17025. Si solo se realiza una dilución o si el laboratorio no trabaja bajo aseguramiento de calidad, entonces deben usarse dos placas acorde a la ISO 8199.

10.2.3 Técnicas de placa vertida

10.2.3.1 Generalidades

Extraer los volúmenes definidos de la dilución a examinar, tocando la punta de la pipeta contra el lateral del tubo para eliminar el exceso de líquido que se adhiere al exterior. Levante la tapa de la placa de Petri lo suficiente para insertar la pipeta, entonces dispense el contenido. Vierta el medio de agar fundido de 44 °C a 47 °C en cada placa de Petri². Evite verter el medio directamente en el inóculo. Inmediatamente mezcle cuidadosamente el medio fundido y el inóculo hasta obtener una distribución homogénea de los microorganismos dentro del medio. Deje que se enfríe y solidifique colocando las placas de Petri en una superficie horizontal fría (el tiempo de solidificación del agar no deberá exceder los 10 min.).

Después de sacar el medio con agar atemperado del baño de agua, seque el frasco con una toalla limpia para prevenir la contaminación de las placas con el agua. Evite derramar el medio por fuera del frasco o en el interior de la tapa de la placa cuando vierta el mismo.

Esto puede requerir que se agarre el frasco en una posición casi horizontal o refrenar el vaciado del medio del frasco entre pasos de vertimiento.

Si se espera la presencia de colonias que se expanden (por ejemplo, *Proteus* spp.) en el producto a examinar, añada a las placas solidificadas una sobrecapa de agar no nutritivo estéril o el mismo

² Generalmente 18 ml a 20 ml de agar en placas de Petri de 90 mm, para obtener al menos 3 mm de espesor.

agar que el del medio de cultivo utilizado en el ensayo³, para prevenir o minimizar la expansión.

10.2.4 Inoculación de la superficie

10.2. 4.1 Generalidades

Los métodos de plaqueo diseñados para producir solamente colonias en placas con medio con agar tienen ciertas ventajas sobre el método de placa vertida. La morfología de la superficie de las colonias se observa fácilmente, mejorando la habilidad del analista para distinguir entre diferentes tipos de colonias.

Los microorganismos no se exponen al calor del medio fundido, por lo que se pueden obtener mayores conteos.

Use placas pre-vertidas, de al menos 3 mm de espesor del medio con agar, que estén niveladas y libres de burbujas de aire y que tengan húmeda la superficie.

Para facilitar la diseminación uniforme, la superficie del agar solidificado debe secarse de acuerdo con la NC-ISO/TS 11133 o como se especifique en la Norma Cubana o Internacional en particular tal que el inóculo se absorba dentro de los 15 min.

10.2. 4.2 Método de diseminación con espátula

Utilizando una pipeta estéril, transfiera el inóculo (usualmente 0,1 ml ó 0,5 ml) de la muestra de ensayo líquida o de la suspensión inicial en el caso de otras muestras a la placa con agar (90 mm ó 140 mm de diámetro, respectivamente). Repita este paso para la próxima dilución decimal (las colonias a ser contadas estarán entonces presentes en un paso de dilución de 10^{-1} en el caso de material de muestra líquido y 10^{-2} en el caso de otro material de muestra) y, si es necesario, repita para otras diluciones decimales.

Si es necesario detectar conteos microbianos bajos en el caso de ciertos productos, el límite de detección puede incrementarse en un factor de 10 analizando 1,0 ml de la muestra en el caso de productos líquidos y 1,0 ml de la suspensión inicial en el caso de otros productos. Para este propósito, 1,0 ml del inóculo se disemina sobre la superficie de una placa de Petri grande (140 mm de diámetro) o sobre las superficies de tres placas de Petri pequeñas (90 mm de diámetro).

Utilizando una espátula para diseminación hecha de cristal, plástico o acero (por ejemplo, hecha de un cristal redondo y con forma similar a un bastón de jockey con diámetro de aproximadamente 3,5 mm y longitud de 20 cm, torcida en ángulos rectos de aproximadamente 3 cm desde el inicio hasta el final y achatada en las terminaciones por calentamiento), esparza el inóculo sobre la superficie del medio tan rápido como sea posible, sin tocar las paredes laterales de la placa de Petri. Deje las placas con las tapas cerca de 15 min. a la temperatura del cuarto para que el inóculo se absorba.

En ciertos casos (señalado en la Norma Cubana o Internacional pertinente), el inóculo puede ser depositado sobre una membrana, entonces se dispersa como se describió anteriormente.

³ Generalmente 5 ml de agar en placas de Petri de 90 mm.

10.2.4.3 Método de placa-espiral

10.2.4.3.1 Generalidades

El método de placa-espiral para la determinación del nivel de microorganismos se ha probado en ensayos interlaboratorio con leche y productos lácteos y con otros alimentos.

El equipamiento usado – sembrador en espiral – se describió en 5.24.

10.2.4.3.2 Preparación de la placa con agar

Un dispensador automático con un sistema de vaciado estéril se recomienda para la preparación de las placas con agar, para ayudar a asegurar que las placas estén a nivel.

Vierta la misma cantidad de agar dentro de todas las placas para obtener la misma altura y que la punta de la aguja del sembrador en espiral mantenga el ángulo de contacto correcto.

Alternativamente, pueden emplearse placas con medio listo para el uso, preparadas comercialmente.

10.2.4.3.3 Procedimiento de plaqueo y enumeración

Descontamine la punta de la aguja y los conductos, pasando primero, solución de hipoclorito de sodio (vea 5.24.4) y después agua estéril a través del sistema antes de pasar la muestra líquida por la aguja.

Coloque la placa pre-vertida con agar en un plato de Petri en el disco giratorio y baje la aguja. La muestra se dispersa diferenciadamente en función de cómo la punta de la aguja añade el fluido en la superficie de la placa de agar que se encuentra rotando. Quite la placa inoculada y retorne la aguja a su posición original. Descontamine la aguja y cargue para inocular otra placa.

Después de la incubación, ponga la rejilla de conteo de la placa-espiral centralmente en el lugar. Use la regla de conteo de 20 para conteos determinados. Seleccione cualquier división en cuña y comience contando colonias desde el extremo más externo del primer segmento a través del centro hasta que se han contado 20 colonias. Complete el conteo de las colonias restantes en el segmento que contiene las veinte colonias. Cuenten 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 esas dos áreas. Los volúmenes de muestra asociados con cada porción de la rejilla de conteo se dan en el manual de operación que acompaña cada sembrador en espiral.

10.2.5 Incubación

A no ser que se indique otra cosa en las normas específicas, invierta inmediatamente las placas una vez que se han inoculado, y colóquelas rápidamente en la incubadora fijada en la temperatura apropiada. Si ocurre una excesiva deshidratación (por ejemplo, a 55 °C o en el caso de una fuerte circulación de aire), envuelva las placas holgadamente en bolsas plásticas antes de la incubación o utilice cualquier sistema de eficiencia equivalente.

Durante el período de incubación, las variaciones más pequeñas en la temperatura de incubación pueden ser inevitables y aceptables, por ejemplo, durante las operaciones usuales de carga o descarga de la incubadora, pero es importante que estos periodos se mantengan en el mínimo. La duración de esas variaciones debe ser

monitoreada para asegurar que no tienen un efecto significativo en el resultado.

NOTA En ciertos casos, puede ser útil tener la previsión de almacenar placas a $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ para usar en comparación con las placas inoculadas incubadas cuando se realice el conteo, con el fin de evitar confundir las partículas del producto que está siendo examinado, con las colonias. Un cristal de aumento binocular puede emplearse también para distinguir las partículas del producto de las colonias.

En determinadas circunstancias, puede desearse para la organización del trabajo en los laboratorios refrigerar las placas inoculadas por un máximo de 24 h previos a la incubación. Si esto se realiza, el laboratorio deberá asegurar que esta práctica no afecta los conteos resultantes.

Generalmente, no deben formarse pilas de más de 6 placas de Petri de altura para la incubación aeróbica y las mismas deben estar separadas unas de otras y de las paredes de la incubadora por al menos 25 mm. Sin embargo, pilas mayores con menos espacio pueden aceptarse en incubadoras que posean sistema de circulación de aire; en este caso, la distribución de la temperatura debe verificarse.

Después de la incubación, las placas deben ser normalmente examinadas inmediatamente. De otro modo, las mismas pueden almacenarse, a no ser que se especifique otra cosa, hasta 48 horas en el refrigerador. El almacenamiento refrigerado por periodos más largos solo es aceptable si se ha demostrado que no tiene efectos en los números, la apariencia o la subsiguiente confirmación de las colonias. Con ciertos medios que contienen colorantes indicadores, se debe permitir a las placas refrigeradas equilibrar la temperatura a la del cuarto antes de realizar el examen, para asegurar que se recobre el color correcto.

10.3 Cálculo y expresión de los resultados obtenidos con medios sólidos

10.3.1 Conteo de colonias

Después del período de incubación señalado en la norma específica, cuente las colonias (colonias totales, colonias típicas o colonias presuntivas) para cada placa que contenga menos de 300 colonias (o cualquier otra cantidad señalada en la norma específica).

Cuando se cuentan colonias típicas o presuntivas, la descripción de las colonias deberá ofrecerse en la norma específica.

En ciertos casos, puede ser difícil contar las colonias (por ejemplo, cuando estén presentes microorganismos expansivos). Considere las colonias expansivas como colonias simples. Si menos de un cuarto de la placa está sobrecrecido por la expansión, cuente las colonias en la parte no afectada de la placa y calcule a partir de esto el número para la placa entera. Deduzca por extrapolación el número teórico que debe corresponder a toda la placa. Si más de un cuarto de la placa está sobrecrecido, descarte el conteo. Considere las colonias expansivas en forma de cadenas como una colonia.

En varios métodos de cálculo que se brindan en 10.3.2, pueden ser tomadas placas que no contienen ninguna colonia para el cálculo.

Cuando se ha empleado el sembrador en espiral, el cálculo de colonias se realiza como se describió en 10.2.4.3.3.

10.3.2 Expresión de resultados

10.3.2.1 Generalidades

10.3.2.1.1 Los casos correspondientes a esta subcláusula son casos generales:

- inoculación de una placa de Petri, de 90 mm de diámetro por dilución;
- número máximo de conteo para el total colonias presentes: 300 por placa;
- número máximo total de colonias (típicas y atípicas) presentes en una placa cuando se cuenten colonias típicas o presuntivas: preferiblemente 300 por placa;
- número máximo de conteo para colonias típicas o presuntivas: 150 por placa;
- número de colonias presuntivas inoculadas para identificación o confirmación (ver 10.3.2.3) en cada placa retenida: en general 5;

Estas situaciones están definidas en las normas específicas.

Cuando se usan placas con diámetro diferente de 90 mm, el número máximo de colonias se incrementará o decrecerá proporcionalmente al área de superficie de las placas (o membranas).

10.3.2.1.2 Los métodos de cálculo definidos abajo toman el conteo de los casos que ocurren más frecuentemente cuando los ensayos se llevan a cabo de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio. Podrían ocurrir casos especiales ocasionalmente (por ejemplo, la razón de los factores de dilución usados para dos diluciones sucesivas podría ser muy diferente), y es entonces necesario que los resultados obtenidos de los conteos sean examinados e interpretados por un microbiólogo calificado, y si es necesario, refutados.

10.3.2.2 Método de cálculo: caso general (conteo de colonias totales o colonias típicas)

Para que un resultado sea válido, en general se considera que es necesario contar las colonias en al menos una placa que contenga como mínimo 10 colonias [colonias totales, colonias típicas o colonias que cumplen con el criterio de identificación (ver 10.3.2.3)].

Calcule el número N de microorganismos presentes en la muestra de ensayo, como la media ponderada de dos diluciones sucesivas utilizando Ecuación (1):

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

Donde:

ΣC es la suma de las colonias contadas en las dos placas retenidas de las dos diluciones sucesivas, al menos una de las cuales contiene 10 colonias;

V es el volumen del inóculo aplicado a cada placa, en mililitros;

d es la dilución correspondiente a la primera dilución retenida [$d = 1$ cuando es retenido el producto líquido no diluido (para muestras líquidas)].

Redondee los resultados calculados para dos cifras significativas. Para esto, si la tercera cifra es menor que 5, la cifra anterior no se modifica; si la tercera cifra es mayor o igual a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad.

Expresé el resultado preferiblemente como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por la potencia apropiada de 10, o un número completo con dos cifras significativas.

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

EJEMPLO: el conteo ha dado los siguientes resultados:

- en la primera dilución retenida (10^{-2}): 168 colonias

- en la segunda dilución retenida (10^{-3}): 14 colonias

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

Redondeando el resultado como se especifica anteriormente, el número de microorganismos es 17 000 ó $1,7 \times 10^4$ por mililitro o por gramo del producto.

10.3.2.3 Método de cálculo: después de la identificación

Cuando el método utilizado requiere identificación, un número dado A (generalmente 5) de colonias presuntivas se identifica de cada una de las placas retenidas para el conteo de las colonias. Después de la identificación, calcule, para cada una de las placas, el número a de las colonias que cumplen con el criterio de identificación, utilizando Ecuación (2):

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

Donde

b es el número de colonias que cumple con el criterio de identificación entre las colonias confirmadas A ;

C es el número total de colonias presuntivas contadas en la placa.

Redondee el resultado calculado hasta el número entero más próximo. Cuando haga esto, si la primera cifra después del punto decimal es menor que 5, no modifique la cifra anterior, si la primera cifra después del punto decimal es mayor o igual que 5, incremente en una unidad la cifra precedente.

Calcule el número N de microorganismos identificados presentes en la muestra de ensayo sustituyendo ΣC por Σa en la ecuación dada en 10.3.2.2.

Redondee el resultado como se especificó en 10.3.2.2.

Expresé el resultado como se especificó en 10.3.2.2.

EJEMPLO: el conteo ha dado los siguientes resultados:

- En la primera dilución retenida (10^{-3}): 66 colonias
- En la segunda dilución retenida (10^{-4}): 4 colonias.

Los resultados de las colonias seleccionadas fueron:

- De 66 colonias, 8 colonias fueron probadas, 6 de las cuales cumplieron con los criterios; de ahí que $a = 50$;
- De 4 colonias, las 4 cumplieron con los criterios; de ahí que $a = 4$

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

Por redondeo de los resultados como se especificó en 10.3.2.2, el número de microorganismos es 49 000 ó $4,9 \times 10^4$ por mililitro o por gramo de producto.

10.3.2.4 Método de cálculo: Conteos bajos

10.3.2.4.1 Caso de una placa (muestra de ensayo o suspensión inicial o primera dilución) conteniendo menos de 10 colonias

Conteos desde 10 hasta el límite superior (práctico) de cada método están en el rango óptimo de precisión. Sin embargo, la precisión decrece rápidamente en la medida que decrece el número de colonias por debajo de 10. Dependiendo de los propósitos del ensayo, un límite inferior de la determinación puede ser definido como se muestra debajo para conteos menores que 10.

Acorde con la ISO/TR 13843, la definición de límite de la determinación es: "La concentración promedio más baja de la partícula x por porción analítica donde se esperó que la incertidumbre estándar relativa, se iguale a un valor específico (RSD)". RSD es la desviación estándar relativa, la cual se calcula dividiendo el estimado de la desviación estándar s para una población a partir de una muestra por la media \bar{x} para esta muestra. El símbolo w será usado en lugar de RSD para la desviación estándar relativa. Esto es, $w = s / \bar{x}$

En el caso de una distribución de Poisson, x es calculada por la ecuación:

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

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

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

Entonces, resultados basados en conteos menores que 4 deberían ser tratados como mera detección de la presencia del microorganismo.

Resumiendo:

Si la placa contiene menos de 10 colonias, pero al menos 4, calcule el resultado como se explica en el caso general (10.3.2.2), e infórmelo como el número estimado 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 también baja y el resultado será informado como:

“Presencia de microorganismos pero menos que $(4 \times d)$ por gramo o mililitro”

10.3.2.4.2 Caso cuando la placa (muestra de ensayo o suspensión inicial o primera dilución) no contiene colonias

Si la placa que contiene la muestra de ensayo (productos líquidos) o la suspensión inicial (otros productos) o la primera dilución inoculada o retenida, no contiene ninguna colonia, informe el resultado de la forma siguiente:

“Menos que $1/d$ microorganismo por mililitro” (productos líquidos) o “Menos que $1/d$ microorganismo por gramo” (otros productos)

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

10.3.2.4.3 Casos especiales

10.3.2.4.3.1 Generalidades

Estos casos conciernen al conteo de colonias típicas o colonias presuntivas.

10.3.2.4.3.2 Caso 1

Si el número de colonias típicas y atípicas para la placa que contiene una primera dilución d_1 es mayor que 300 (o cualquier otro número establecido en una norma específica), con colonias típicas o confirmadas visibles, y si la placa que contiene la dilución subsecuente d_2 , contiene menos de

300 colonias (o cualquier otro número establecido en una norma específica), y hay colonias no típicas o confirmadas visibles, informe los resultados de la forma siguiente:

“menos que $1/d_2$ y más que $1/d_1$ microorganismos por mililitro” (productos líquidos) o “menos que $1/d_2$ y más que $1/d_1$ microorganismos por gramo” (otros productos).

Donde d_1 y d_2 son los factores de dilución correspondiente a las diluciones d_1 y d_2 .

EJEMPLO: el conteo ha dado los siguientes resultados:

- En la primera dilución retenida (10^{-2}): más de 300 colonias en la placa, con colonias típicas o confirmadas presentes;
- En la segunda dilución retenida (10^{-3}): 33 colonias, con colonias no típicas o confirmadas presentes.

El resultado, expresado en microorganismos, es menos de 1 000 y más de 100 por mililitro o por gramo de producto.

10.3.2.4.3.3 Caso 2

Si el número de colonias típicas y atípicas para la placa que contiene una primera dilución d_1 es mayor que 300 (o cualquier otro número establecido en una norma específica), sin colonias típicas o confirmadas visibles, y si la placa que contiene la dilución subsecuente d_2 , contiene menos de 300 colonias (o cualquier otro número establecido en una norma específica), y hay colonias no típicas o confirmadas visibles, informe los resultados de la forma siguiente:

“menos que $1/d_2$ microorganismos por mililitro” (productos líquidos) o “menos que $1/d_2$ microorganismos por gramo” (otros productos)

Donde d_2 es el factor de dilución correspondiente a la dilución d_2 .

EJEMPLO: el conteo ha dado los siguientes resultados:

- En la primera dilución retenida (10^{-2}): más de 300 colonias en la placa, con colonias no típicas o confirmadas presentes;
- En la segunda dilución retenida (10^{-3}): 33 colonias, con colonias no típicas o confirmadas presentes;

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

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 presuntivas) es mayor que 300 (o cualquier otro número establecido en una norma específica), para la placa que contiene la primera dilución d_1 , con un número de colonias (colonias totales, colonias típicas o colonias cumpliendo con los criterios de identificación) menor que 10 para la placa que contiene la dilución subsiguiente d_2 :

- Si el número de colonias para la placa que contiene de la dilución d_1 está dentro del intervalo de 334 a 300 (parte superior del intervalo de confianza para una media ponderada igual a 300),

utilice el método de cálculo para casos generales (ver 10.3.2.2);

- Si el número de colonias para la placa que contiene la dilución d_1 es mayor que 334 (límite superior del intervalo de confianza para una media ponderada igual a 300), sólo tome en cuenta el resultado del conteo de la dilución d_2 y calcule un conteo estimado (ver 10.3.2.4), excepto, cuando se refiere a un número máximo de 300 para el conteo de colonias, si este conteo estimado es menor que 8 (límite inferior del intervalo de confianza para una media ponderada igual a 10), ya que la diferencia entre las dos diluciones es entonces inaceptable.

Las cifras correspondientes a los intervalos de confianza se adaptarán al número máximo establecido para las colonias contadas.

EJEMPLO 1: el conteo ha dado los siguientes resultados:

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

Use el método de cálculo para casos generales, empleando las placas de las dos diluciones retenidas.

EJEMPLO 2: el conteo ha dado los siguientes resultados:

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

Informe un conteo estimado sobre la base de las colonias contadas en la placa de la dilución 10^{-3} .

EJEMPLO 3: el conteo (cuando un número máximo de 300 ha sido fijado para el conteo de colonias) ha dado los siguientes resultados:

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

El resultado de este conteo es inaceptable.

EJEMPLO 4: el conteo (cuando un número máximo de 150 ha sido fijado para el conteo de colonias) ha dado los siguientes resultados:

- En la primera dilución retenida (10^{-2}): más de 167 colonias en la placa (límite superior del intervalo de confianza con una media ponderada igual a 150);
- En la segunda dilución retenida (10^{-3}): 7 colonias.

El recuento estimado se expresa en función del recuento realizado en la placa de dilución de 10^{-3} .

10.3.2.5.2 Si el conteo de colonias (colonias totales, colonias típicas o colonias presuntivas) para cada una de las placas para todas las diluciones inoculadas es mayor que 300 (o cualquier otro

número establecido en una norma específica), informe el resultado como sigue:

“más que 300/ d ” (en el caso de colonias totales o colonias típicas) o “más que 300 x b/A x $1/d$ ” (en el caso de colonias confirmadas), expresada en microorganismos por mililitro (productos líquidos) o microorganismos por gramo (otros productos)

Donde

d es la dilución correspondiente a la última dilución inoculada;

b es el número de colonias que cumple con el criterio de identificación entre las colonias presuntivas A .

10.3.2.5.3 Si la placa que contiene la última dilución tiene más que 10 y menos que 300 (o cualquier otro número establecido en una norma específica) colonias (colonias totales, colonias típicas o colonias presuntivas), calcule el número N' de microorganismos presentes usando la Ecuación (4):

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

Donde

c es el número de colonias contadas en la placa;

V es el volumen del inóculo aplicado a cada placa, en mililitros;

d es la dilución correspondiente a la dilución retenida.

Redondee los resultados como se especificó en 10.3.2.2.

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

EJEMPLO: el conteo ha dado los siguientes resultados:

- En la primera dilución inoculada (10^{-4}): 120 colonias;

Entonces

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

Redondeando el resultado como se especificó en 10.3.2.2, el número N' de microorganismos es 1 200 000 ó 1.2×10^6 por mililitro o por gramo de producto.

10.3.2.6 Medición de la incertidumbre

Ver ISO/TS 19036 para determinaciones cuantitativas.

10.4 Enumeración de levaduras y hongos filamentosos

10.4.1 Generalidades

Las levaduras y los hongos filamentosos se enumeran usualmente por la técnica de placa vertida, la cual permite una enumeración más fácil o por la técnica de siembra por diseminación en placa la cual ofrece una exposición máxima de las células al oxígeno atmosférico y evita el estrés por calor proveniente del agar fundido. Las placas vertidas previamente se secarán antes de ser inoculadas (Ver NC-ISO/TS 11133).

Algunas levaduras y los hongos filamentosos pueden ser infecciosos o producir respuestas alérgicas, a veces incluso en individuos saludables. Por lo que es importante tomar precauciones razonables cuando se está trabajando con ellos. Idealmente, las placas se mantendrán en una incubadora, no en un cuarto abierto. Las tapas de las placas no deberán levantarse con frecuencia, normalmente esto solo debe hacerse para propósitos esenciales tales como la preparación para un examen microscópico. Las agujas flameadas se enfriarán antes de hacer la transferencia, para evitar que se dispersen las conidias y otras células. Las mesetas de trabajo y las incubadores se desinfectarán rutinariamente.

Las placas de Petri se incubarán en posición no invertida y de forma que no sean movidas hasta que no se encuentren listas para realizar el conteo, ya que el movimiento puede provocar la liberación de las conidias o de las esporas de los hongos filamentosos y el subsiguiente desarrollo de colonias satélites, dando un sobreestimado de la población.

10.4.2 Conteo de colonias para levaduras y hongos filamentosos

Usualmente se cuentan las placas con 10 a 150 colonias. Si la microbiota consiste principalmente de hongos filamentosos, seleccione las placas que contengan conteos con en el rango de población menor; Si la microbiota consiste principalmente de levaduras, las placas que contengan conteos mayores al límite superior podrían seleccionarse para conteo.

Si la identificación de las colonias es dudosa, realice un fresco o una tinción de las células de al menos 5 colonias por muestra para confirmar que no hay bacterias presentes.

10.5 Enumeración empleando un medio líquido

10.5.1 Principio

Las porciones de ensayo se inoculan en un medio líquido que se diseñó para sostener el crecimiento de un microorganismo en particular o de un grupo de microorganismos, y que a menudo inhiben la proliferación de microorganismos no-objeto de estudio.

Para determinar si ha habido crecimiento del microorganismo objeto de estudio, diferentes criterios pueden ser empleados, ejemplo: detección visual de turbidez, producción de gas, cambios de color, subsiguiente aislamiento de los microorganismos en un medio de agar selectivo. La composición del medio de crecimiento y el criterio para discriminar entre un resultado positivo y uno negativo se definen en las normas correspondientes.

Empleando esta condición, solamente puede ser atribuido un valor cualitativo a cada porción de ensayo, o sea el resultado es positivo o negativo. Para obtener un estimado de la cantidad de microorganismos que están presentes, es necesario examinar algunas porciones de ensayo y usar procedimientos estadísticos para determinar el número más probable (NMP).

10.5.2 Inoculación

10.5.2.1 Generalidades

Si se usa un medio de crecimiento selectivo, la adición de la porción de ensayo no reducirá sus propiedades selectivas (permitiendo con ello el crecimiento de microorganismos no-objeto de estudio). En la mayoría de las normas, se describe en el objeto la información acerca de la compatibilidad de una matriz específica, pero deberá tenerse cuidado con matrices tales como especies, cocoa, caldo de carne, etc., ya que estos pueden contener sustancias inhibitorias del crecimiento las cuales requieren la adición de compuestos neutralizantes, el uso de mayores factores de dilución, centrifugación, filtración o separación inmunomagnética para separar los microorganismos objetos de estudio de la matriz, aunque esto no siempre esté definido en las normas específicamente en las normas correspondientes. La incompatibilidad puede también ser debido a la composición biológica de la matriz: muestras ambientales altamente contaminadas, productos fermentados o productos con bacterias prebióticas obviamente representa un reto mayor para el microbiólogo analítico que las muestras que contienen solo muy pocos microorganismos. Para estas matrices problemáticas, se ejecutarán experimentos empleando microorganismos representativos, para verificar que los métodos son realmente compatibles con la matriz.

10.5.2.2 Procedimiento

A menos que se disponga otra cosa en las normas correspondientes, volúmenes de las porciones de ensayos menores o iguales a 1 ml, generalmente se añaden a 5 a 10 veces el volumen del medio de simple fuerza. Las porciones de ensayo entre 1 ml y 100 ml se añaden normalmente a iguales volúmenes de medio de doble fuerza.

Para volúmenes mayores a 100 ml, podría usarse medio más concentrado. Para propósitos especiales, el medio deshidratado estéril podría disolverse en la muestra fría (o precalentada a 30 °C) para ser analizada.

A menos que se disponga otra cosa, el tiempo transcurrido entre la preparación de la primera dilución de una muestra y la inoculación del último tubo, placa de multipocillos o frasco, debe ser menor de 15 min.

Se usará una nueva pipeta estéril para cada dilución.

10.5.3 Selección del sistema de inoculación

La esencia del método de NMP es la dilución de una muestra a tal grado que el inóculo, a veces pero no siempre, contendrá microorganismos viables. El “resultado”, por ejemplo, el número de inóculo que produce crecimiento en cada dilución, dará un estimado de la concentración inicial de la bacteria en una muestra. En este orden, para obtener estimados sobre un amplio rango de concentraciones posibles, el microbiólogo usa diluciones seriadas, incubando algunos tubos (o placas, etc.) de cada dilución. El Número Más Probable (NMP) de microorganismos presentes en la muestra original, y la precisión del estimado, puede calcularse por procedimientos estadísticos en base al número de tubos positivos y negativos observados después de la incubación.

Realice una selección de diferentes configuraciones de NMP disponibles acorde a:

- 1 el número de microorganismos esperado en una muestra bajo investigación,
- 2 los requerimientos regulatorios,
- 3 la precisión que se necesita, y
- 4 cualquier otra consideración práctica.

La medición de la incertidumbre depende del número de porciones de ensayo positivas observadas de forma similar la medición de la incertidumbre de una colonia depende del número de colonias en una placa. La medición de la incertidumbre se incrementa como una función de la raíz cuadrada del número de tubos usados. El número de tubos tiene que ser cuadruplicado a la mitad de la medición de la incertidumbre. Cuando los sistemas tienen solo unos pocos tubos, la medición de la incertidumbre es baja.

En dependencia de su talla, las porciones de ensayo pueden ser inoculadas en tubos o frascos que contengan la cantidad requerida de medio líquido. Para pequeñas porciones de ensayo se pueden usar placas multipocillos.

10.5.3.1 Sistema de dilución simple

Cuando la concentración de microorganismos esperada es pequeña o se espera que solo varíe moderadamente, el sistema de inoculación más apropiado son simples series de tubos de iguales porciones de ensayo. Donde la razón esperada entre el número máximo y mínimo de microorganismos es menor que aproximadamente 25, diez porciones de ensayo paralelas es el menor número que se espera que funcione; con 50 tubos paralelos, una razón de 200 es el límite. Ejemplos de dilución simple se muestran en el Anexo B, Tablas B.1 a B.4

10.5.3.2 Sistema de dilución múltiple

Cuando la concentración de microorganismos en la muestra es desconocida, o si se anticipa gran variación, podría ser necesario inocular series de tubos de algunas diluciones. Inocular un número suficiente de diluciones para asegurar un sistema con resultados positivos y negativos. El número de diluciones también depende del método de cálculo usado para la estimación del valor de NMP. Si se necesita usar las tablas, entonces tiene que disponerse de los resultados de tres diluciones, y las configuraciones de los sistemas son estrictas a aquellos disponibles en las tablas. Con programas de computación, los números de diluciones y los tubos paralelos no se restringen.

10.5.3.3 Sistema de dilución simétrico

El sistema de NMP simétrico más comúnmente aplicado usa 3 ó 5 tubos paralelos por dilución. La precisión obtenida con este sistema declina rápidamente con el empleo de menores números de tubos por dilución. Los resultados de un diseño de tres tubos son un criterio más sólido que otras magnitudes de la concentración. Si se requiere más precisión, se recomienda que se seleccionen 5 ó más tubos paralelos. Los ejemplos de un NMP de tres tubos y de un NMP de cinco tubos se muestran en el Anexo B, Tablas B.5 y B.7, respectivamente.

10.5.3.4 Sistema de dilución no simétrico

En los sistemas no simétricos, los diferentes niveles de diluciones no tienen el mismo número de

tubos. Use estos sistemas solo para estimar números de microorganismos con un rango bien definido. Los ejemplos se refieren en la ISO 8199.

10.5.4 Incubación

Incube los tubos inoculados, frascos o botellas en una incubadora o en un baño de agua. Coloque las placas multipocillos en una incubadora.

Seleccione la duración y la temperatura de incubación según referencia de una norma específica, en dependencia del microorganismo o el grupo de microorganismos que se busca.

Para algunos microorganismos podrían ser necesarios dos condiciones de incubación y/o un paso de confirmación.

Refiérase a las normas específicas para ver los detalles.

10.5.5 Interpretación de resultados

Los criterios que distinguen resultados positivos de negativos varían con cada microorganismo o grupo de microorganismos que se busca y se definen en las normas correspondientes. Usando esos criterios cuente y registre el número de tubos que se obtuvo con resultados positivos con todas las porciones derivadas de una muestra.

10.5.6 Determinación de los valores de NMP

Existen tres posibilidades diferentes para determinar el valor de NMP: cálculo con una fórmula matemática, consulta de las tablas de NMP, o utilización de programas computarizados específicos. Siempre que ellos estén basados en las mismas consideraciones estadísticas, son igualmente válidos. Estos tres métodos se detallan abajo.

10.5.6.1 Fórmula matemática

10.5.6.1.1 Fórmula aproximada para todos los casos

El valor aproximado de NMP para cualquier número de diluciones y tubos paralelos se derivó por la aplicación de la siguiente ecuación (adaptada de la referencia [36]):

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

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, en gramos, de la muestra en todos los tubos con reacciones negativas;

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

El NMP es expresado por masa de referencia de la muestra en gramos (usualmente 1 g, a veces 100 g).

10.5.6.1.2 Solución “exacta” para una serie de tubos

El valor de NMP para una serie simple de tubos se derivó de la fórmula:

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

Donde

- m_r es la masa de referencia de la muestra, en gramos;
- m_m es la masa, en gramos, de la muestra en cada tubo de la serie;
- n 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 Estimación de la precisión para ensayos de dilución simple

Los límites para un 95% de confianza para estimar el NMP pueden ser calculados aproximadamente usando la ecuación:

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

Donde

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

El signo más se relaciona 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 la proporción de tubos positivos se incrementa.

10.5.6.1.4 Estimación de la precisión para ensayos de dilución múltiple simétricos

La incertidumbre estándar del \log_{10} de un sistema de NMP de dilución múltiple simétrica puede obtenerse la ecuación de Cochran aproximada [28]:

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

Donde:

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

f es el factor de dilución entre diluciones consecutivas (principalmente 10);

n es el número de tubos por dilución.

Los límites superior e inferior para un 95% de confianza pueden ser aproximados, respectivamente, multiplicando y dividiendo el estimado de NMP por el antilogaritmo de $2 \times SE$. Este procedimiento tiende a exagerar el límite superior de confianza.

10.5.6.2 Tablas de NMP

10.5.6.2.1 Tablas para sistemas de dilución simple

Las Tablas B.1 a B.4 (Anexo B) dan el valor de NMP y los intervalos para el 95% de confianza por porción de ensayo para 10, 15, 20 y 25 tubos paralelos [cada tubo es inoculado con igual dilución (simple)].

Para expresar el resultado por masa de referencia de la muestra (o volumen para muestras líquidas), multiplique el NMP y el valor del límite para el valor límite del 95% por la razón (masa de referencia)/(masa de la porción de ensayo). No multiplique la incertidumbre estándar logarítmica. La masa de referencia en microbiología de los alimentos es usualmente 1 g. la masa de la porción de ensayo corresponde a la cantidad de muestra (en gramos) que está presente en el volumen usado para inocular los tubos, es decir 0.1 g si se usó 1 ml del homogenizado de 10^{-1} .

EJEMPLO (Referencia [30])

Veinte tubos de caldo doble fuerza 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 mostraron crecimiento visible. ¿Cuál fue la densidad más probable de bacterias (organismos por gramo) en la muestra? La Tabla B.3 da como el número de organismos más probable por tubo 1.61, con un límite inferior para un 95% de confianza de 0.93 y un límite superior para un 95% de confianza de 2.77.

Cada tubo recibió una porción de ensayo de 5 ml, la cual corresponde a 0.5 ml de la muestra. De ahí que, el número más probable de microorganismos en 1 g de muestra está dado por:

$$NMP = 1.61 / 0.5 \text{ por gramo} = 3.2 \text{ por gramo}$$

Con el rango del intervalo para el 95% de confianza desde

Límite inferior para el 95 % = $0.93 / 0.5$ por gramo = 1.9 por gramo;

Límite superior para el 95% = $2.77 / 0.5$ por gramo = 5.5 por gramo;

10.5.6.2.2 Tablas para sistemas de dilución múltiple: tres diluciones sucesivas

Con sistemas simétricos, es una práctica común usar tres diluciones sucesivas con tres (Tabla B.5) o cinco (Tabla B.7) réplicas. Registre el número de resultados positivos para cada conjunto de tubos y, de la tabla de NMP para el sistema de inoculación usado, lea el número más probable de microorganismos presentes en el volumen de referencia de la muestra.

Algunas combinaciones de tubos positivos ocurren más probablemente que otras. Por ejemplo, una combinación de resultados positivos 0, 0, 3 es mucho menos posible que ocurra que la combinación 3, 2, 1. Para cuantificar esta probabilidad, todas las combinaciones de resultados positivos han sido atribuidas con una categoría, en el rango de 0 a 3. Un resultado de categoría 1 es un resultado con mayor probabilidad, mientras que un resultado de categoría 3 es raro y podría no reproducirse fácilmente. Los peores casos son los resultados categoría 0, estos deberían verse con gran desconfianza. Asumiendo que los resultados de los análisis son correctos, se esperaría que el 95% de las combinaciones observadas caerían en la categoría 1, el 4 % en la categoría 2, el 0.9 % en la categoría 3 y sólo el 0.1 % en la categoría 0. Las categorías se explican posteriormente en la Tabla B.6.

En el caso donde se hagan más de tres diluciones, la selección de la combinación “correcta” de las tres diluciones consecutivas no siempre es muy clara. Sin embargo, esta puede hacerse fácilmente registrando todas las posibles combinaciones de tubos positivos y leyendo la categoría correspondiente de la Tabla B.5.

Posteriormente aplique las siguientes reglas:

- 1) Seleccione la combinación de tres diluciones consecutivas que tengan el perfil de la categoría 1 para obtener el índice de NMP. Si se obtiene más de una combinación que tenga un perfil de categoría 1, use el que tenga mayor número de tubos positivos.
- 2) Si no se tiene una combinación que tenga el perfil de la categoría 1, use uno que tenga el perfil de la categoría 2. Si se obtiene más de una combinación que tenga un perfil de categoría 2, use el que tenga mayor número de tubos positivos.
- 3) Si no se tiene una combinación que tenga el perfil de la categoría 2, use uno que tenga el perfil de la categoría 3. Si se obtiene más de una combinación que tenga un perfil de categoría 3, use el que tenga mayor número de tubos positivos.

Algunos ejemplos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 — Ejemplos de la selección de resultados positivos para calcular los valores de NMP

Muestra	Número de los tubos obtenidos desde tres tubos incubados para los siguientes cantidades de muestras por tubos incubados ^{a)}						NMP ^{b)}	
							Productos líquidos (ml ⁻¹)	Otros productos (g ⁻¹)
	Productos líquidos	10 ml	1 ml	10 ⁻¹ ml	10 ⁻² ml	10 ⁻³ ml		
	Otros productos	1 g	10 ⁻¹ g	10 ⁻² g	10 ⁻³ g	10 ⁻⁴ g		
1		<u>3</u>	<u>3</u>	<u>2</u>	1	0	1,1 x 10 ¹	1,1 x 10 ²
2		3	<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	-	2,4 x 10 ¹	2,4 x 10 ²
3		2	2	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	7,4	7,4x 10 ¹
4		<u>3</u>	<u>3</u>	<u>0</u>	0	0	2,4	2,4x 10 ¹
5		<u>2</u>	<u>2</u>	<u>0</u>	1	0	2,1 x 10 ⁻¹	2,1

^{a)} Subrayado indica combinación seleccionada.
^{b)} Calculado a partir del índice del NMP (ver Tabla B.5).

10.5.6.3 Programas computarizados

Los más versátiles programas de computación no ponen restricciones relacionando números de diluciones y tubos paralelos o simétricos del sistema de NMP. El Analizador de Ensayo de NMP es un programa libremente disponible basado en un programa previo (Ver Referencia [29]).

10.5.7 Expresión de los resultados

A partir del índice NMP tomado de la tabla B.5, [de acuerdo con la combinación de las tres (o cinco) diluciones consecutivas retenidas, determine el número más probable de microorganismos en el volumen de referencia.

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

11 Método de detección (método cualitativo)

11.1 Generalidades

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

11.2 Principio

A no ser que se señale otra cosa en la Norma Cubana pertinente, mezcle (productos líquidos) u homogenice (otros productos) una cantidad *P* del producto a examinar con 9 x *P* ml ó 9 x *P* g de un caldo electivo y/o selectivo.

Para facilitar la recuperación de microorganismos sometidos a stress en los alimentos, las muestras son pre-enriquecidas usualmente en un caldo no selectivo, seguido por un enriquecimiento selectivo y aislamiento en un medio sólido selectivo/diferencial. El uso de dos caldos de enriquecimiento diferentes, así como de dos ó más medios sólidos selectivos, incrementa la sensibilidad del método.

Después de la incubación, extienda una porción del cultivo obtenido sobre la superficie de un medio sólido selectivo de manera tal que se obtengan colonias aisladas. A menos que se establezca otra cosa, los caldos enriquecidos incubados pueden ser refrigerados solamente después de realizada la evaluación del impacto de la refrigeración en los resultados y solamente si está claramente estipulado el informe de ensayo.

Un número (generalmente cinco por placa) de las colonias obtenidas después de la incubación se identifica usando las técnicas de confirmación apropiadas.

La selección de las colonias para confirmar deben cubrir los tipos de colonias sospechosas representativas.

11.3 Medición de la incertidumbre

La estimación de la incertidumbre medida de las determinaciones cualitativas está siendo investigado por el ISO /TC 34/SC 9 (Subcomité 9 del Comité Técnico 34 de la ISO).

12 Métodos de confirmación

12.1 Generalidades

Solo use cultivos puros para la confirmación bioquímica y serológica.

Las pruebas de confirmación de referencia se describen en las normas específicas. Como una alternativa a las pruebas bioquímicas descritas en esas normas específicas, pueden usarse los métodos de confirmación descritos en esta cláusula (galerías bioquímicas, pruebas nucleicas) bajo las condiciones descritas en la cláusula, a menos que se señale otra cosa en las normas específicas.

12.2 Preparación de un cultivo puro

Comience la preparación de un cultivo puro mediante la selección de una colonia sobre o en un medio sólido. Entonces inocule la colonia seleccionada en un medio de cultivo sólido no selectivo. Después de la incubación, seleccione una colonia bien aislada para las subsiguientes pruebas de confirmación. Repita la operación si es necesario.

Si es posible, las pruebas de confirmación deben llevarse a cabo usando células de una colonia. Si el material celular es insuficiente en una colonia, este debe primero subcultivarse en un medio líquido o en un medio sólido en cuña, posteriormente el subcultivo se puede usar para las pruebas a ejecutar.

12.3 Tinción de Gram (técnica modificada de Hucker)

12.3.1 Generalidades

Esta coloración de las células bacterianas permite la descripción de la morfología de la bacteria y la clasificación de las mismas en dos grupos como una función, independientemente de que sean

capaces (Gram +) o no de retener el tinte violeta cristal dentro de las condiciones de prueba. Esta división es el resultado fundamentalmente de las diferencias en la estructura de las paredes de las células de los dos grupos y esta se correlaciona con otras diferencias importantes entre los dos grupos.

Una alternativa satisfactoria para la tinción de Gram es el uso de solución de hidróxido de potasio (KOH) al 3 %. Una asada de la bacteria es añadida a dos gotas de solución de KOH. Las bacterias Gram-negativas pondrán la solución muy viscosa y mucoide dentro de los 30 s, formando una cuerda cuando la mezcla se levanta con el asa.

Existen varias vías para conducir la tinción de Gram, pero todas siguen la secuencia dada debajo.

12.3.2 Soluciones

12.3.2.1 Generalidades

Las soluciones que se disponen comercialmente pueden ser empleadas.

En este caso, siga las recomendaciones del fabricante.

12.3.2.2 Solución de violeta cristal

12.3.2.2.1 Composición

Violeta cristal	2.0 g
Etanol (95 %)	20 ml
Oxalato de amonio ($C_2H_8N_2O_4$)	0.8 g
Agua	80 ml

12.3.2.2.2 Preparación

Disuelva el violeta cristal en el etanol y el oxalato de amonio en el agua destilada. Mezcle las dos soluciones y deje que la mezcla repose por 24 horas antes de utilizarla.

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 destilada	100 ml

12.3.2.3.2 Preparación

Disuelva el yoduro de potasio en 10 ml de agua destilada y añada el yodo en fracciones. Después disolviendo, complete hasta 100 ml en un frasco 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, después mezcle con el agua destilada.

12.3.3 Técnica de coloración

Después de fijar flameando un frotis bacteriano en un portaobjetos, el que ha sido preparado a partir de un cultivo de 18 h a 24 h, o cuando el caldo está turbio, cubra el frotis con la solución de violeta cristal. Deje reaccionar durante 1 min.

Enjuague suavemente con agua el portaobjetos inclinado durante unos pocos segundos.

Cubra el portaobjeto con la solución de yoduro. Deje reaccionar por 1 min.

Enjuague suavemente con agua el portaobjetos inclinado durante unos pocos segundos.

Vierta de forma suave y continua una película de etanol (95 %) sobre el portaobjetos inclinado durante un periodo que no exceda los 30 s hasta que no se decolore más el color violeta con este lavado.

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

Seque el portaobjetos.

12.3.4 Interpretación

Examine el portaobjetos bajo el objetivo de aceite de alta potencia del microscopio. Aquellas células bacterianas que presenten un color azul o violeta se denominan Gram-positivas (Gram +); aquellas que estén coloreadas de rosado oscuro a rojo se denominan Gram-negativas (Gram -).

Para un cultivo puro de ciertos tipos bacterianos, se pueden obtener tanto células Gram- positivas como Gram-negativas en un mismo campo del microscopio.

NOTA: Células densamente compactas pueden dar una respuesta no característica.

12.4 Uso de las galerías bioquímicas para la identificación

Las galerías bioquímicas disponibles pueden usarse para la identificación de colonias aisladas.

Verifique que las galerías son apropiadas, atendiendo a estudios de evaluación publicados en literatura científica internacional, preferiblemente relacionadas con la microbiología de los alimentos⁴. Esta verificación es especialmente importante si el productor no tiene datos validados en estas galerías.

El laboratorio debe obtener un certificado de control de cada lote, con una indicación de las cepas de prueba.

El productor deberá también especificar las cepas control que el laboratorio pudiera usar para verificar la preservación de la ejecución de las galerías.

Las galerías deberán incluir, como mínimo, las pruebas bioquímicas descritas en normas específicas o estar suplementadas por otras pruebas.

12.5 Uso de pruebas nucleicas para la identificación

Las pruebas nucleicas disponibles pueden usarse, corrientemente, para la identificación de colonias aisladas.

Sin embargo, verifique que las pruebas nucleicas usadas para la confirmación son apropiadas, atendiendo a estudios de evaluación publicados en la literatura científica internacional, preferiblemente relacionadas con la microbiología de los alimentos (ver ejemplo Referencia [23]). Esta verificación es especialmente importante si el productor no tiene datos validados en estas pruebas.

El laboratorio debe obtener un certificado de control de cada lote, con una indicación de las cepas de prueba.

El productor deberá también especificar las cepas control que el laboratorio pudiera usar para verificar el mantenimiento de la ejecución de la prueba.

12.6 Métodos serológicos

12.6.1 Generalidades

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

12.6.2 Pruebas de aglutinación en lámina

Las reacciones antígeno-anticuerpo causan que las células bacterianas se agrupen y formen una masa viscosa o de gránulos densos. En el caso de las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, la reacción entre el antígeno "H" (flagelar) y sus antisueros homólogos resulta en una agrupación viscosa, mientras que la reacción que involucra al antígeno "O" (somático) resulta en una agrupación granular más densa.

Antes de la aglutinación con antisueros, debe llevarse a cabo una prueba para determinar si las células bacterianas aglutinan en solución de cloruro de sodio [3 % (por masa)]. Si las células bacterianas aglutinan, la cepa es autoaglutinable y no debe ser aglutinada con antisuero.

⁴ La solicitud de información debe estar dirigida al centro de referencia nacional, regional o internacional indicado para cada microorganismo.

Los antisueros comercialmente disponibles son de dos tipos: antisueros polivalentes, los cuales reaccionan con microorganismos de un género particular o con grupos de serovares y que se encuentran disponibles para estudios preliminares, y anticuerpos monoclonales específicos, el uso de los cuales permite la identificación de un serovar particular.

El laboratorio debe obtener un certificado de control de cada lote de antisuero, con una indicación de las cepas de prueba.

Verifique que las pruebas de aglutinación en lámina son apropiadas, atendiendo a estudios de evaluación publicados en la literatura científica internacional, preferiblemente relacionadas con la microbiología de los alimentos⁵.

Cuando utilice los reactivos, debe usar controles negativos y positivos disponibles.

12.6.3 Pruebas de aglutinación en látex

Existe un método comercial más rápido disponible en el mercado, que emplea partículas de látex cubiertas con anticuerpos específicos de grupo (ejemplo: *Escherichia coli* O157, ver la norma específica ISO 16654, o *Staphylococcus aureus* en la ISO 6888). El antígeno en el extracto se prueba contra un rango de reactivos de látex.

Verifique que las pruebas de aglutinación en látex son apropiadas, atendiendo a estudios de evaluación publicados en la literatura científica internacional, preferiblemente relacionadas con la microbiología de los alimentos⁵.

El laboratorio debe obtener un certificado de control de cada lote, con una indicación de las cepas de prueba.

Cuando utilice los reactivos, debe usar controles negativos y positivos disponibles.

13 Informe de ensayo

El informe de ensayo especificará el método usado, la temperatura de incubación, si es necesario, y los resultados obtenidos. También mencionará cualquier detalle de la operación no especificado en esta norma, así como aquellos considerados opcionales, junto con los detalles de cualquier incidente que pudiera haber influido en los resultados.

Recoja también en el informe de ensayo, si ensayos ulteriores son llevados a cabo por un laboratorio de referencia o, si tales ensayos han sido llevados a cabo, qué resultados dieron.

El informe de ensayo debe incluir toda la información necesaria para la identificación completa de la muestra. También es apropiado incluir toda la información necesaria para la interpretación de los resultados de los ensayos.

Si es necesaria, la medición de la incertidumbre, determinada de acuerdo con la ISO/TS 19036, debe incluirse en el informe de ensayo.

⁵ La solicitud de información debe estar dirigida al centro de referencia nacional, regional o internacional indicado para cada microorganismo.

14 Validación de métodos microbiológicos

14.1 Validación de métodos de referencia

La validación de los métodos de referencia está siendo investigada por ISO/TC 34/SC 9.

14.2 Validación de métodos alternativos

Refiérase a la ISO 16140 para el protocolo técnico para la validación de métodos alternativos contra métodos de referencia.

14.3 Validación de métodos propios

La validación de los métodos propios está siendo investigada por ISO/TC 34/SC 9.

15 Aseguramiento de la calidad de los resultados / control de calidad del rendimiento

15.1 Control interno de la calidad

15.1.1 El control interno de la calidad consiste de todos los procedimientos emprendidos por un laboratorio para la evaluación continua de su trabajo. El principal objetivo es asegurar la consistencia de los resultados diarios y su conformidad bajo criterios bien definidos.

15.1.2 Es necesario un programa de control periódico para demostrar que la variabilidad (entre analistas, entre equipos o entre materiales) está bajo control. Todos los ensayos incluidos en el alcance de la actividad del laboratorio necesitan ser cubiertos.

El programa podría involucrar:

- el uso de muestras que se contaminan, con niveles variables de contaminación, incluyendo microbiota acompañante y objeto de estudio;
- el uso de muestras contaminadas intencional/naturalmente para un rango de matrices;
- el uso de materiales de referencia (incluyendo materiales de esquema de ensayos de competencia);
- ensayos replicados;
- evaluación replicada de los resultados de los ensayos.

El intervalo entre estos controles está influenciado por la naturaleza de los ensayos llevados a cabo por el laboratorio y por la frecuencia a la cual los ensayos se realizan.

Se recomienda que, cuando sea posible, los ensayos deben incorporar controles para monitorear la ejecución.

15.1.3 En casos especiales, un laboratorio puede ejecutar un ensayo particular solo raramente. Se reconoce que, en tales casos, es inapropiado llevar a cabo un programa de control interno y que un esquema para demostrar la ejecución satisfactoria es factible de llevar a cabo en paralelo.

15.2 Cepas de referencia

Referirse a la NC-ISO/TS 11133 para el mantenimiento de las cepas de referencia.

15.3 Ensayos externos de calidad (Ensayos de aptitud)

Los laboratorios deben participar regularmente en esquemas de ensayos de aptitud los cuales sean aplicables para el alcance de su actividad. Debe darse preferencia a los esquemas de ensayos de competencia que usan matrices apropiadas.

Los laboratorios deben usar la valoración externa de la calidad no solo para conocer el sesgo del laboratorio, sino también para controlar la validez de todo su sistema de calidad.

Anexo A
(informativo)

Propiedades de algunos desinfectantes

Tabla A.1 — Propiedades de algunos desinfectantes

Desinfectantes	Actividad contra							Inactivado por					Toxicidad		
	Hongos	Bacterias		Micro-bacterias	Esporas	Virus lipídicos	Virus no lipídicos	Proteínas	Materiales naturales	Materiales sintéticos	Agua dura	Detergentes	Piel	Ojos	Pulmones
		Positivas	Negativas												
Hipocloritos	+	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	+	C	+	+	+
Alcoholes	-	+++	+++	+++	-	+	+	+	+	+	+	-		+	
Formaldehído	+++	+++	+++	+++	+++ ^a	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Glutaraldehído	+++	+++	+++	+++	+++ ^b	+	+	+	+	+	+	NA	+++	+++	+++
Iodóforos	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	+	A	+	+	

+++ bueno;
 ++ ligeramente bueno;
 + ligero;
 - no actúa
 V depende del virus;
 C catiónico;
 A aniónico;
 NA no aplicable;
 a alrededor de 40°C
 b alrededor de 20 °C

Fundente Resistencia [17]

Anexo B
(normativo)

Determinación del número más probable (NMP)

Tabla B.1 — Valores de NMP por porción de ensayo y límites de confianza del 95% para una serie de 10 tubos, calculado de acuerdo con la Referencia [29]

Número de tubos positivos	Series de 10 tubos			
	NMP	Incertidumbre estándar de $\text{Log}_{10}\text{NMP}$	Límites del 95%	
			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 porción de ensayo y límites de confianza del 95% para una serie de 15 tubos, calculado de acuerdo con la Referencia [29]

Número de tubos positivos	Series de 15 tubos			
	NMP	Incertidumbre estándar de $\text{Log}_{10}\text{NMP}$	Límites del 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 porción de ensayo y límites de confianza del 95% para una serie de 20 tubos, calculado de acuerdo con la Referencia [29]

Número de tubos positivos	Series de 20 tubos			
	NMP	Incertidumbre estándar de $\text{Log}_{10}\text{NMP}$	Límites del 95%	
			Inferior	Superior
1	0,05	0,307	0,01	0,36
2	0,11	0,251	0,03	0,42
3	0,16	0,218	0,05	0,50
4	0,22	0,195	0,08	0,60
5	0,29	0,178	0,12	0,69
6	0,36	0,165	0,16	0,80
7	0,43	0,155	0,20	0,91
8	0,51	0,147	0,25	1,03
9	0,59	0,140	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 porción de ensayo y límites de confianza del 95% para una serie de 25 tubos, calculado de acuerdo con la Referencia [29]

Número de tubos positivos	Series de 25 tubos			
	NMP	Incertidumbre estándar de $\text{Log}_{10}\text{NMP}$	Límites del 95%	
			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

Tabla B.5—Índices de NMP y límites de confianza (95 %) cuando se usan porciones de ensayo de 1 g (ml), tres de 0.1g (ml) y tres de 0.01g (ml)

No. de resultados positivos			Índice de NMP ^a	Categoría ^b	Límites de confianza (95 %) ^{a, c}	
					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	4,0
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	36,0
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			

^a Fuente: Referencia [27].

^b Ver Tabla B.6.

^c los límites de confianza dados en esta tabla solamente intentan ofrecer una idea de la influencia de las variaciones estadísticas en los resultados. Incluso existen también otras fuentes de variación, las cuales pueden a veces ser siempre más importantes.

Tabla B.6 — Explicación de las categorías de resultados

Categoría ^a	Definición
1	Cuando el número de bacterias en la muestra es igual al NMP hallado, este resultado es uno de los que tienen mayor probabilidad de obtenerse. A lo sumo existe solamente una oportunidad de un 5 % de obtener un resultado que es menos probable que el de menor probabilidad en esta categoría.
2	Cuando el numero de bacterias en la muestra es igual al NMP hallado, este resultado es uno de los que tiene menor oportunidad de obtenerse que incluso el menos probable de la categoría 1, sin embargo hay a lo sumo solamente una oportunidad de un 1 % de obtener un resultado que es menos probable que el de menor probabilidad en esta categoría.
3	Cuando el numero de bacterias en la muestra es igual al NMP hallado, este resultado es uno de los que tiene menor oportunidad de obtenerse que incluso el menos probable de la categoría 2, sin embargo hay a lo sumo solamente una oportunidad de un 1% de obtener un resultado que es menos probable que el de menor probabilidad en esta categoría.
0	Cuando el numero de bacterias en la muestra es igual al NMP hallado, este resultado es el que tiene menor probabilidad de obtenerse que incluso el menos probable de la categoría 3. Existe solamente una oportunidad de un 0.1 % de obtener un resultado en esta categoría, incluso sin que haya ningún error.
^a Antes de comenzar el ensayo, deberá decidirse qué categoría será aceptable, es decir, solamente la 1; la 1 y la 2 o incluso la 1, la 2 y la 3. Si la decisión a adoptar sobre la base de los resultados es muy importante, solamente los resultados de la categoría 1 o a lo sumo los de las categorías 1 y 2 deberán aceptarse. Los resultados de la categoría 0 deben considerarse con extrema precaución.	

Tabla B.7 — Valores de NMP por gramo de muestra y límites de confianza del 95 % (cuando se usan cinco porciones de ensayo de 1 g, cinco de 0.1g y cinco de 0.01g)

No. de tubos que dan reacción positiva			NMP (por gramo)	Límites de confianza (95 %) ^{a, c}	
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

Tabla B.7 (continuación)

No. de tubos que dan reacción positiva			NMP (por gramo)	Límites de confianza (95 %) ^{a, c}	
5 de 1 g	5 de 0,1 g	5 de 0,01 g		Inferior	Superior
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
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	-	-

Bibliografia

- [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 microbiological testing*, American Association for Laboratory Accreditation (A2LA) (1998)
- [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*, Editions Medicales Flammarion (4th edn.)
- [8] APHA Technical Committee on Microbiological Methods for Foods. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 2nd 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, 12th 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 preenrichment 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.* 1994, 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 drikkevandsprøver ved 0-5 °C i et døgn medfører en signifikant reduktion i antal *Escherichia coli* og kimtal, *Dansk. Vet.* 2002 17, pp. 1-9
- [15] HARREWIJIN, G.A., and HARTOG, B.J. Guidelines to perform microbiological analyses of food and foodproducts ("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 monocytogenes* 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.* 1983, 55, pp. 159-64
- [30] NIEMELA, S. *Statistical evaluation of results from quantitative microbiological examinations*, Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) Report No. 1, 2nd 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, 9th 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*, 2nd edition, Springer, New York, NY, 2001

[35] KREGER-VAN RIJ, N.J.W. *The yeasts — A taxonomic study*, 3rd 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 (all parts), *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method 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] NCISO/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 method 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*