



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 1 529-2:99

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS TOMA, ENVÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

Primera Edición

(MICROBIOLOGICAL CONTROL OF FOODS. SAMPLING, SENDING AND PREPARATION OF TEST SAMPLES FOR MICROBIOLOGICAL EXAMINATION).

First Edition

DESCRIPTORES: Alimentos, análisis microbiológico, muestras, toma de muestras, envío de muestras, preparación de muestras.

AL 01.05-318

CDU: 614.31:579.67:543.05

CIU: 9320

ICS: 07.100.30

Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria	CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS TOMA, ENVÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	NTE INEN 1 529-2:99 1999-02
---	--	--

1. OBJETO

1.1 Esta norma, según la naturaleza del producto, establece los procedimientos generales para la toma de muestras de alimentos, el envío al laboratorio y su preparación en el laboratorio.

2. ALCANCE

2.1 Los procedimientos establecidos en esta norma para la preparación de la muestra se refieren al tratamiento inicial al que se deben someter las muestras de alimento destinadas al análisis microbiológico, según se indica en la serie de NTE "INEN 1529 Control Microbiológico de los Alimentos", excepto en las NTE INEN 1529-1 y 1529-12.

2.2 Esta norma no se aplica para casos de brotes epidémicos o intoxicaciones, ni para decidir el tamaño de la muestra.

3. DEFINICIONES

3.1 Para los efectos de esta norma se adoptan las definiciones contempladas en cada una de las Normas Técnicas Ecuatorianas (NTE) INEN de Requisitos sobre alimentos y las que a continuación se detallan:

3.1.1 *Lote*. Es la cantidad de alimento producida y manipulada bajo condiciones que se suponen uniformes. En la práctica, esto generalmente significa un alimento producido en un batch, o cuando el proceso es continuo dentro de un período de tiempo definido y en un lugar determinado, por ejemplo, en una línea de producción determinada, en un autoclave u otra unidad crítica de tratamiento. Los diferentes lotes son identificados mediante códigos.

3.1.2 *Partida*. Es la cantidad de alimento, grande o pequeña, enviada a un determinado destinatario. Normalmente consiste en numerosas cajas de alimento procedente de uno o más lotes.

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

3.1.4 *Unidad de muestreo*. Es la parte definible más pequeña de un lote (unidad de producción). Esto puede significar una lata, o un paquete. Cuando la producción es a granel y se envasa en cajas, bidones, barriles, sacos, etc., entonces la unidad de muestreo es arbitraria y puede depender del utensilio para tomar muestras. No se debe confundir esta unidad de muestreo con la unidad de muestra realmente utilizada en el análisis.

3.1.5 *Unidad de muestra*. Es la cantidad de material (tomada de la muestra de población) que realmente se utiliza en el análisis, es la unidad analítica. En general, para los ensayos microbiológicos se utiliza una unidad de muestra de 10 ó 25 g ó cm³ o sus múltiplos.

3.1.6 *Muestra*. Parte del conjunto (población) a partir de la cual se trata de estimar, mediante análisis o examen, las propiedades del conjunto. Se debe tener en cuenta que sólo puede someterse a análisis una parte (unidad de muestra) de la muestra de población (ver 3.1.5 y 3.1.7).

(Continúa)

DESCRIPTORES: Alimentos, análisis microbiológico, muestras, toma de muestras, envío de muestras, preparación de muestras.

3.1.7 Muestra de población. Número total (una o más) de unidades de muestreo individuales tomadas de la población (idealmente, obtenidas de una forma aleatoria) que se destinan al análisis de acuerdo con un programa de muestreo determinado (ver nota 1)

3.1.8 Muestra selectiva (sesgada). Es la muestra de alimento, tomada para demostrar o documentar las condiciones insatisfactorias observadas por el inspector, o bien, para contar con una unidad del alimento que se sospecha insatisfactorio y someterlo al análisis microbiológico.

3.1.9 Muestra aleatoria. Conjunto de unidades de muestreo elegidas de la población de modo que cada unidad tenga la misma probabilidad de ser seleccionada, con lo que se excluye las subjetividades del que toma las muestras. Normalmente implica la utilización de la tabla de los números aleatorios.

3.1.10 Muestra representativa. Es aquella cuyas características son tan similares como posible a las de la población de la cual proceden.

3.1.11 Programa de muestreo. Es la relación de los criterios de aceptación que se aplicarán a un lote basados en el análisis, por métodos específicos, del número necesario de unidades de muestra.

3.1.12 Programa de atributos. Es el programa de muestreo en que cada unidad de muestra seleccionada se clasifica de acuerdo a las características de calidad del producto y en el que solo hay dos o tres grados de calidad. Por ejemplo: aceptable, rechazable; presente, ausente; aceptable, provisionalmente aceptable, rechazable; recuento bajo, recuento medio, recuento alto (ver nota 2).

3.1.13 Categoría. Serie de factores relacionados con la naturaleza y tratamiento de un alimento, enmarcados en 15 series (1 a 15 categorías), que determina por anticipado el peligro de la presencia de determinadas especies o grupos bacterianos en un alimento.

3.1.14 "n". Número de unidades de muestra de un lote que se deben analizar, para satisfacer las exigencias de un determinado programa de muestreo.

3.1.15 "c". Número máximo aceptable de unidades de muestra que pueden presentar una tasa microbiana comprendida entre "m" y "M". Cuando se encuentra un número superior a "c", se rechaza el lote.

3.1.16 "m". Valor (criterio) microbiológico aceptable de bacterias por gramo o cm³. Los valores superiores a "m" se aceptan provisionalmente o se rechazan.

3.1.17 "M". Valor (criterio) microbiológico utilizado solo en programas de tres clases, para separar la calidad rechazable de la provisionalmente aceptable. En cualquier unidad de muestra, los valores iguales a, o superiores a "M" no son aceptables.

3.1.18 Aceptación-rechazo. La decisión de aceptar o rechazar un lote, en base a un programa de muestro asociado a un análisis microbiológico determinado, se aplica solo al propósito para el que se realizó dicho análisis (o varios de ellos).

NOTA 1 La muestra de población y la unidad de muestra pueden ser lo mismo pero, de preferencia, la muestra de población debe ser considerablemente más grande que la unidad de muestra que habrá de analizarse y cada muestra de población proporciona sólo un resultado por cada análisis realizado. Por tanto, si se analiza más de una unidad de muestra de la misma muestra de población, los resultados se promedian.

NOTA 2 En las Normas Técnicas Ecuatorianas (NTE) de requisitos se utilizan programas de muestreo por atributos, de dos y tres clases. Un programa de muestreo de dos clases requiere de las siguientes especificaciones: "n", "c" y "m" y los de tres clases: "n", "c", "m" y "M".

(Continúa)

3.1.19 Suspensión inicial (dilución primaria). Es la suspensión, solución o emulsión obtenida después que la cantidad del producto en análisis (o de la porción de muestra preparada para el ensayo) ha sido pesada o medida y luego mezclada, utilizando un homogeneizador cuando es necesario y observando las precauciones apropiadas, con un volumen de diluyente igual a nueve veces la unidad de muestra, para que los microorganismos presentes en la unidad de muestra se distribuyan lo más uniformemente posible y se permita que las partículas grandes, si las hay, se sedimenten (ver nota 3).

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

4. EQUIPO, MATERIAL Y DILUYENTES

4.1 Generalidades

4.1.1 El equipo y material utilizados en la toma de muestras deben ser de acero inoxidable u otro material de resistencia adecuada, que no produzca cambios en la muestra que puedan afectar los resultados de los exámenes subsiguientes. El equipo debe ser lo suficientemente robusto para evitar deformaciones en el uso y lo suficientemente leve que permita al operador moverlo en el producto, fácil y rápidamente. Si los utensilios o aparatos son soldados, la suelda debe resistir temperaturas de 180°C. Todas las superficies deben ser lisas y libres de hendiduras, todas las esquinas deben ser redondeadas. El equipo para tomar muestras debe cumplir con los requisitos específicos adecuados a cada producto.

4.1.2 Los frascos para muestras y sus cierres, deben ser de un material resistente a esterilizaciones repetidas, inerte, impermeable al agua y a las grasas (acero inoxidable, vidrio y algunos plásticos). También se puede utilizar envases desechables de plástico, hojas de aluminio o fundas plásticas con cierres apropiados. De preferencia deben ser opacos y de capacidad y forma adecuadas para tomar la unidad de muestra deseada. Los frascos para productos sólidos, semisólidos o viscosos deben ser de boca ancha.

4.1.3 Todo el material y utensilios utilizados en la toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico deben estar perfectamente limpios, secos, envueltos individualmente y esterilizados por uno de los siguientes métodos físicos:

4.1.3.1 Vapor a presión de 15 libras/ pulgada² (autoclave): 121°C durante 20 min, mínimo.

4.1.3.2 Aire caliente: 170-175°C, en el punto más frío, durante 1 h, mínimo. Utilizar un horno con una eficiente circulación de aire para que haya la seguridad de que en todas las partes del horno se mantiene la temperatura fijada. Si por alguna razón, es imposible la esterilización por estos dos métodos, utilizar los siguientes métodos alternos, que son secundarios, y se los recomienda siempre que el material sea utilizado inmediatamente después de esterilizado y enfriado.

4.1.3.3 Vapor fluente: 100°C por una hora.

4.1.3.4 Agua hirviendo: ebullición en agua por 20 min, mínimo.

NOTA 3 En algunos casos puede necesitarse, especialmente para productos que dan una suspensión inicial 1+9 demasiado viscosa o demasiado espesa, añadir más diluyente. En algunos otros casos, cuando se necesita relacionar los resultados de los análisis con determinados criterios de especificación, puede ser necesario una dilución primaria más concentrada que 1+9. Estos factores deben ser tenidos en cuenta para las operaciones subsiguientes y/o en la expresión de resultados.

OBSERVACIÓN. Las definiciones contenidas en los numerales 3.1 al 3.18, inclusive, son según la FAO y la "International Commission on Microbiological Specifications for Foods" (ICMSF).

(Continúa)

4.1.3.5 Inmersión en etanol al 96% (v/v) y flameado hasta que el etanol se consuma. Para materiales que resisten la llama directa.

4.1.3.6 Combustión: exponer a la llama de un mechero de Bunsen o de alcohol hasta la incandescencia y enfriar. Para objetos que resistan la incandescencia.

4.2 Equipo y material

4.2.1 *Para abrir envases:* tijeras, cuchillos, abridores de latas y de botellas, martillos, alicates, destornilladores, herramienta especial para abrir cajas de cartón, bisturíes, etc.

4.2.2 *Para tomar muestras:* sierras; sondas especiales que penetren en el producto y corten un trozo cilíndrico; taladros; cucharas; cucharones de draga; pinzas; tenedores; torundas; plantillas de metal, con un cuadrado de superficie conocida recortado en el centro; fundas plásticas con cierre apropiado; papel aluminio; compuesto obturante, para cerrar los orificios dejados en los quesos al tomar las muestras.

4.2.3 *Para tomar muestras congeladas:* taladro eléctrico de alta velocidad, hacha, cincel.

4.2.4 *Para controlar la temperatura:* termómetro manual de cuadrante, para controlar la temperatura ambiente y del producto.

4.2.5 *Para transportar muestras:* refrigeradora portátil capaz de enfriar hasta 0°C a 5°C en poco tiempo. Nevera isotérmica con cierre hermético y material aislante entre la pared interna y la externa, para transportar muestras congeladas o refrigeradas.

4.2.6 *Para etiquetar:* etiquetas y marcadores.

4.2.7 *Equipo para esterilización:* autoclave u horno portátiles o mechero de alcohol, y un agente desinfectante (alcohol al 70%).

4.2.8 *Equipo para mantener muestras:* refrigeradora, para almacenar muestras a 2°C y congelador para almacenar a temperaturas menores de -20°C.

4.2.9 *Equipo para descongelar muestras:* baño de agua controlado termostáticamente con agitador, que opere $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y otro, a $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.2.10 *Frascos para muestras:* frascos de boca ancha con tapa de rosca, envases desechables de plástico. Para el transporte de muestras deben ser de un material que absorba los golpes.

4.2.11 *Equipo para homogeneizar muestras:* homogeneizadores, vortex, trituradores, "stomacher", molinos.

4.2.12 *Equipo para medir el pH:* pH metro, con compensación de temperatura y sensibilidad de 0,1 de unidad de pH.

4.2.13 *Equipo para pesar muestras:* Balanza con exactitud clase II y graduación mínima de 0,1 g.

4.2.14 *Materiales varios:* erlenmeyers, probetas, tubos, pipetas, jeringuillas.

4.3 Diluyentes

4.3.1 Agua peptona al 0,1% : para uso general.

4.3.2 Agua peptona tamponada: para *Salmonella*.

4.3.3 Agua peptona sal al 15%: para extremadamente halófilos.

(Continúa)

- 4.3.4** Agua peptona sal al 5%: para halófilos moderados y halotolerantes.
- 4.3.5** Caldo TSB: para revitalización.
- 4.3.6** Caldo reforzado para clostridios: para anaerobios.
- 4.3.7** Solución de calgón [hexametáfosfato sódico, $(\text{NaPO}_3)_6$] al 1% en solución Ringer diluida al ¼: diluyente para hisopos de alginato.
- 4.3.8** Solución de citrato sódico al 2%, pH $7,5 \pm 0,1$: para quesos, leches fermentadas, leche en polvo "roller".
- 4.3.9** Solución de fosfato dipotásico al 2%: para caseína ácida, caseína láctica y suero ácido en polvo el diluyente debe tener un pH de $8,4 \pm 0,1$ y $7,5 \pm 0,1$ para crema ácida, quesos, caseínatos.
- 4.3.10** Solución de fosfato tripotásico ($\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) al 8% para ajustar el pH de las muestras.
- 4.3.11** Solución Ringer al 1/4: para mantequillas
- 4.3.12** Solución de sacarosa al 20%: para osmófilos.
- 4.3.13** Solución salina peptonada: para uso general.

5. TOMA DE MUESTRAS

5.1 Disposiciones administrativas (ver nota 4)

5.1.1 La toma de muestras debe realizar un agente autorizado o un agente independiente autorizado que ha recibido formación técnica apropiada. El o la agente debe actuar independientemente y no aceptar la interferencia de terceros. Bajo su responsabilidad puede recibir ayuda de otros. Cuando sea posible, se debe permitir a los delegados de las partes interesadas presenciar la toma de muestras. El agente y su(s) ayudante debe tomar las medidas adecuadas para prevenir cualquier contaminación tanto del envío [o lote(s)] como de las unidades de muestreo (por ejemplo, lavarse y desinfectarse las manos antes de manipular el material a muestrearse, vestir un delantal u overol blanco y limpio, usar mascarilla y gorro, trabajar observando rigurosamente todas las medidas previstas en el programa de la planta para la higiene y desinfección de los empleados).

5.1.2 Se sellará y etiquetará cada muestra. Fijar el sello de manera que sea imposible remover el contenido o la etiqueta sin destruir el sello. Las etiquetas deben ser de tamaño y calidad adecuadas para el propósito (por ejemplo una cartulina de color claro, un cartón a prueba de grasa y de agua y con un ojete reforzado). Escribir la información con tinta indeleble indicando, por lo menos, la naturaleza del producto, el número y código del lote, la fecha de la toma de muestras, el nombre y la firma del agente que tomó las muestras. Cuando sea necesario, se puede incluir información adicional tal como el propósito de la toma de muestras, la masa o volumen de la muestra, la marca de identificación de la unidad (caja, bidón, etc.) de donde se tomó la muestra.

5.1.3 Se tomarán todas las muestras, cuando menos, por duplicado y se conservarán en condiciones idénticas a las que tenían en el momento de la toma. De ser necesario, y cuanto antes, se debe poner una serie a disposición de la otra parte. Previo convenio de las partes, se recomienda la toma de series adicionales de muestras, las cuales, en caso necesario, deben guardarse para un arbitraje independiente. Una vez tomadas las muestras, enviar las muestras al laboratorio para su análisis.

NOTA 4 Las siguientes instrucciones no son necesariamente aplicables para tomar muestras de rutina.

(Continúa)

5.1.4 Las muestras se deben acompañar de un informe de la toma de muestras firmado por el agente responsable de la toma y refrendado por posibles testigos. En el informe debe constar la siguiente información:

5.1.4.1 Lugar, fecha y hora en que se realizó la toma de muestras.

5.1.4.2 Nombre y dirección del agente que realizó la toma de muestras y de los posibles testigos.

5.1.4.3 Método exacto de la toma de muestras (aleatorio en todo el lote, aleatorio en las partes accesibles o por otro método).

5.1.4.4 Procedimiento exacto utilizado para tomar las muestras, si éste difiere de las instrucciones dadas en esta norma.

5.1.4.5 Motivo de la toma de muestras.

5.1.4.6 Naturaleza del alimento.

5.1.4.7 Número y código del lote, códigos de los baches y el número y tamaño de las unidades que constituyen el lote.

5.1.4.8 Tamaño y número de las muestras de población debidamente identificadas en relación al lote, bache y/o unidad (caja, bidón, etc.) del cual proceden.

5.1.4.9 Lugar a donde se enviarán las muestras.

5.1.4.10 Ensayos solicitados.

5.1.4.11 Nombre y dirección del laboratorio que analizará las muestras.

5.1.4.12 Temperatura del producto al momento de la toma de muestras.

5.1.4.13 Origen del envío y lugar de destino.

5.1.4.14 Si es posible, el nombre y la dirección del fabricante, importador, vendedor o comprador, según proceda.

5.1.4.15 Cuando convenga, se debe mencionar en el informe, además, cualquier condición o circunstancia relevante de la toma de muestras (por ejemplo, el estado de los envases y sus alrededores, la temperatura y humedad atmosféricas, la edad del producto, método de esterilización del material para tomar muestras), si la muestra es una mezcla de submuestras y cualquier información especial referente al producto muestreado, por ejemplo, la dificultad para homogeneizar el producto.

5.2 Número de muestras de población que se deben tomar

5.2.1 Se debe tomar un número de muestras de población equivalente al número "n" de unidades de muestra indicado en el programa de muestreo especificado, ya sea, en las respectivas NTE de requisitos o en un contrato, o según lo acordado entre las partes interesadas o según un programa diseñado para enfrentar una situación emergente (brote de intoxicación, por ejemplo).

5.3 Técnicas para la toma de muestras

5.3.1 Generalidades

(Continúa)

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

5.3.1.2 Antes de abrir un envase limpiar la zona apropiada con agua tibia y jabón y pasar alcohol al 70% sin flamear, o si es un envase de papel, retirar la parte externa. Abrir el envase asépticamente con instrumentos estériles. Para cada envase utilizar un instrumento estéril.

5.3.1.3 Cuando sea posible, mezclar bien el producto hasta que esté homogeneizado y, cuando no lo es, asépticamente, tomar alícuotas de diferentes sitios del recipiente hasta completar una cantidad no inferior a 100 g ó cm³.

5.3.1.4 Si se han de realizar diferentes tipos de análisis (microbiológicos, químicos, físicos y sensoriales), asépticamente tomar primero y por separado las unidades de muestra destinadas al análisis microbiológico. Para conservar estas muestras no se debe utilizar preservantes

5.3.1.5 Registrar la temperatura del aire de la sala de almacenamiento o del vehículo, tomar la muestra, luego, insertar el termómetro en el alimento del que se tomó la muestra y registrar su temperatura. Cuando el alimento está envasado en pequeños envases cerrados, registrar la temperatura del alimento en un envase adyacente en la misma caja de cartón o embalaje.

5.3.1.6 El tamaño de la muestra de población debe ser de 100 cm³ o gramos, mínimo. En muchos casos será el de la unidad de producción del lote como latas herméticamente cerradas conteniendo muchas veces la cantidad de alimento equivalente a la unidad de muestra, o envases muy pequeños de los que se necesitará tomar varios de ellos hasta completar los 100 g.

5.3.2 *Procedimientos para tomar muestras*

5.3.2.1 *Productos en envases pequeños.* Los alimentos, sean éstos líquidos, pastosos, sólidos o pulverulentos envasados en pequeños recipientes deben tomarse en su propio envase original, sin abrir.

- a) Las mantecas, margarinas, mantequillas que se encuentren en unidades de 250 o más g, dividir las en cuatro partes y tomar como muestras las dos cuartas partes opuestas. Si la unidad pesa menos de 250 g, tomar toda la unidad.
- b) De los quesos pequeños y de las porciones de queso envueltas y empacadas en envases pequeños tomar como muestra un queso completo y de las porciones, un número suficiente de ellas para que la muestra no sea inferior de 100 g.

5.3.2.2 *Productos a granel (bidones, tambores, etc.).*

a) *Productos líquidos.*

- a.1) Evitando contaminar el contenido, mezclar los productos líquidos cuidadosamente con un cucharón estéril o mecánicamente, hasta que el producto esté totalmente mezclado; inmediatamente después de la mezcla, con un cucharón estéril y asépticamente transferir a un envase estéril una cantidad no inferior a 100 cm³. Si es difícil obtener una buena homogeneización, de sitios apropiados del recipiente tomar varias submuestras de manera a obtener una muestra no inferior a 100 cm³ y que sea representativa del envase. Inmediatamente cerrar y etiquetar el frasco. Para tomar una muestra de un ducto de salida, primero dejar pasar las primeras fracciones del producto para limpiar la salida con el flujo y luego tomar la muestra, no menos de 100 cm³.
- a.2) En el caso de cremas, dar un número suficiente de golpes con el cucharón para asegurar una buena mezcla, sumergir el cucharón moviendo de un lado para otro con mucho cuidado para evitar la formación de espuma y de mantequilla. Tomar no menos de 100 cm³ de muestra.

(Continúa)

a.3) En el caso de leche condensada y evaporada mezclar muy cuidadosamente utilizando un agitador adecuado para raspar el material adherido a las paredes y al fondo del recipiente. Del contenido mezclado, trasladar de 2 a 3 litros a un recipiente más pequeño y agitarlo. Tomar no menos de 100 cm³ de muestra.

b) *Productos sólidos.*

b.1) En el caso de productos sólidos, cuando la capa superficial no hace parte de la muestra, retirarla del área de muestreo con una espátula, cuchillo o cuchara estériles, hasta no menos 5 mm de profundidad y tomar la muestra con otro instrumento estéril. Si el producto es un polvo, la capa superficial se retira antes de mezclar. Si el alimento está formado por capas o extractos, separadamente y evitando contaminar las partes tomar muestras de cada una en la misma proporción en que se encuentran en el producto original.

b.2) En el caso de mantecas, margarinas, mantequillas a granel y el producto está en bloque, y para que la muestra no sea inferior a 100 g, realizar dos sondajes o más introduciendo una sonda verticalmente en el centro del bloque. Si el producto se encuentra en barriles, insertar la sonda diagonalmente a través de la masa del producto desde el borde del barril sin que penetre en la superficie del fondo. En los dos casos, hacer girar la sonda una vuelta completa y retirar el material por completo. Sostener la punta de la sonda encima de la abertura del frasco estéril, y con un cuchillo o espátula transferir inmediatamente la muestra de la sonda en pedazos de aproximadamente 75 mm. Dejar una porción de aproximadamente 25 mm o más de largo para obturar el agujero dejado por la sonda. No permitir que estos productos entren en contacto con papel o superficies absorbentes (porcelana) del agua o grasa. Los productos congelados hasta el punto de resistir la presión de la sonda deben ser ablandados manteniéndoles por 24 h a 10°C.

5.3.2.3 *Productos a granel congelados.* Para muestrear estos productos utilizar brocas, saca bocados y otros instrumentos cortantes estériles. Los productos congelados deben mantenerse en su estado congelado hasta su llegada al laboratorio (ver 6.7). Se debe evitar descongelar y congelar nuevamente la muestra.

a) La toma de muestras de piezas o bloques de alimentos de gran tamaño se puede realizar de la siguiente manera: sobre el alimento asegurar, con la copa hacia arriba, un embudo plástico estéril con el vástago recortado por donde se introduce la broca estéril de un taladro. Las virutas del alimento son conducidas a la superficie y se acumulan en la copa del embudo. Transferir estas virutas a un frasco estéril para muestras. Inmediatamente identificar la muestra y acondicionarla para su envío al laboratorio.

5.3.2.4 *Toma de muestras de superficies vivas.* Utilizando un hisopo humedecido, frotar la superficie de la palma de una mano, la superficie interna de los dedos y de las uñas (ver 5.3.2.7 literal b.1). También se puede realizar mediante la técnica del lavado: colocar la mano dentro de una funda plástica, verter 50 cm³ de diluyente y frotar con el líquido las palmas, entre los dedos y uñas.

5.3.2.5 *Toma de muestras de superficies inertes.*

a) Botellas, envases, recipientes, utensilios pueden muestrearse mediante lavado, y si es posible, con hisopo (ver 5.3.2.7 literal b.1). Prestar especial atención a la porción de los utensilios que se introduce en la boca, por ejemplo, borde superior interno y externo de copas y vasos, porción cóncava de cucharas, etc. De los platos, la parte que entra en contacto con los alimentos.

(Continúa)

- b) La toma de muestras de superficies lisas puede realizarse con hisopo (ver 5.3.2.7 literal b.1) o con cilindros de agar. El cilindro de agar es un medio de agar estéril solidificado dentro de un tubo plástico estéril. Asépticamente, cortar uno de los extremos del cilindro, presionar la superficie de agar descubierta contra la superficie en estudio, con un escalpelo estéril cortar una rodaja y colocarla en una placa Petri, con la superficie sembrada hacia arriba. Identificar la muestra.
- c) Las superficies lisas también se pueden muestrear utilizando un portaobjeto (ver 5.3.2.7 literal b.3).

5.3.2.6 Toma de muestras destinadas al análisis de bacterias anaerobias. Evitar que las muestras que contienen bacterias anaerobias entren en contacto con el aire, por ejemplo, de los tejidos profundos no tomar muestras pequeñas. Si esto no es posible y si se utilizan hisopos, humedecer el hisopo en el medio de transporte de Stuart (medio reducido), ver NTE INEN 1529-1 y una vez tomada la muestra, colocar el hisopo en un tubo que contenga este medio.

5.3.2.7 Otros

- a) *Quesos grandes.* En el caso de quesos grandes tomar de las diferentes partes suficientes submuestras, hasta completar una muestra de por lo menos 100 g. De los maduros, retirar la envoltura externa y dejar intacta la interna (costra, cera, películas plásticas o de tela en los quesos sin corteza). Dependiendo de la forma, la masa, el tipo y el grado de madurez del queso, utilizar una de las siguientes técnicas:
 - a.1) *Toma de muestras por medio de cortes.* Si el queso tiene una base circular, con un cuchillo con hoja puntiaguda, hacer dos cortes radiales a partir del centro del queso, y si tiene un base rectangular, hacer dos cortes paralelos con los lados. El tamaño de la pieza obtenida debe ser de tal manera, que una vez eliminada la capa superior incomible, la porción comestible restante no sea inferior a 100 g.
 - a.2) *Toma de muestras por medio de una sonda.*
 - a.2.1) En una de las superficies planas, por lo menos a 10 cm del borde, insertar oblicuamente hacia el centro una sonda estéril de 15 a 20 mm de diámetro, una o varias veces.
 - a.2.2) Insertar la sonda perpendicularmente por una de las superficies del queso hasta llegar, pasando por el centro, al lado opuesto.
 - a.2.3) Por la superficie vertical del queso, a igual distancia entre las dos superficies planas, insertar la sonda horizontalmente hasta el centro del queso.
 - a.2.4) De los quesos contenidos en barriles, cajas u otros recipientes de dimensiones grandes, o de los quesos que forman cubos grandes compactos, la muestra puede tomarse insertando la sonda oblicuamente, desde arriba hacia abajo, por el contenido del recipiente.
 - a.2.5) En el caso de quesos duros de grandes dimensiones, si el queso tiene envoltura interna, frotar con etanol al 70% (V/V) el sitio de muestreo e insertar una sonda estéril de 15 a 20 mm de diámetro. Girar la sonda una vuelta completa y retirar el pedazo. Si no se necesita una muestra de la superficie, guardar la parte exterior (mínimo 2 cm) que contiene la envoltura interna para obtener el agujero(s) hecho en el queso y el resto del pedazo(s) con un escalpelo o un cuchillo estériles transferir asépticamente al frasco de muestra. Repetir este procedimiento hasta obtener una muestra no menor de 100 g. Con los tapones, obturar los agujeros con cuidado, y si es posible, cubrir con un compuesto sellante adecuado, ver NTE INEN 1529-1.

(Continúa)

b) *Toma de muestras de canales vacunas y ovinas.* Muestrear las canales con una de las siguientes técnicas:

- b.1) *Hisopos o torundas.* Con guantes estériles colocar la plantilla (ver 4.2.2) sobre la superficie que se va a muestrear. Tomar asépticamente un hisopo, abrir un tubo que contenga el diluyente adecuado, humedecer el hisopo y con movimientos rotatorios presionarlo contra las paredes del tubo para retirar el exceso de diluyente. Friccionar fuertemente el área de la superficie que se va a examinar, haciendo frotos paralelos con una ligera rotación del hisopo. Friccionar nuevamente la superficie haciendo trazos paralelos perpendiculares a los anteriores, repetir tres veces este proceso humedeciendo cada vez el hisopo. Cuidar que se frote toda el área elegida. Regresar el hisopo al tubo y con una tijera estéril o cualquier otro implemento cortar o quebrar el palillo y dejar caer la cabeza dentro del tubo, tapar el tubo con la tapa de rosca y colocarlo en un envase a prueba de agua, acondicionar el envase con hielo picado o cualquier otro refrigerante disponible. Si el bastón no es de madera, agitar el hisopo en el tubo 10 veces hacia arriba y abajo. Identificar la muestra. Para realizar recuentos, utilizar la cantidad necesaria del diluyente para obtener una dilución inicial de 10^{-1} .
- b.2) *Toma de muestras por disección.* Con un escalpelo y pinza estériles tomar lonchas superficiales muy delgadas de aproximadamente 2 mm de espesor de la herida del sacrificio, región pectoral, costado, regiones sacra, anal, renal y cuello. De las canales de cerdo, tomar a partir del cuello y del área situada detrás de las orejas. Colocar las lonchas en el frasco para muestras. Tomar una muestra no menor de 100 g
- b.3) *Toma de muestras con portaobjetos.* Este método se utiliza especialmente para recuentos directos. Presionar un portaobjeto estéril contra la muestra del alimento, identificar y dejar que se seque. Enviar al laboratorio donde se fija, tiñe y se observa al microscopio. Para determinaciones cualitativas rápidas de la microflora dominante proceder de la siguiente manera: después de presionado el porta contra la superficie de la carne aplicar el porta a la superficie de agar de una placa y retirarlo con una pinza estéril y luego incubar la placa.

6. ENVÍO DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO.

6.1 Enviar las muestras al laboratorio lo más rápido posible y en condiciones que reduzcan al mínimo la posibilidad de cambio de su calidad microbiológica y evitar que durante el transporte las muestras sean expuestas a la luz solar directa.

6.2 Manipular y empacar las muestras de modo que una manipulación posterior no pueda cambiar su identidad ni sugerir ninguna duda a cerca de su identidad.

6.3 Siempre que sea posible, se deben enviar las muestras al laboratorio en su envase original, sin abrir. Todas las muestras envasadas, para su envío deben empacarse con materiales que puedan absorber los golpes para evitar que sufran daños durante el transporte.

6.4 Los productos de vida comercial prolongada, no necesitan de precauciones especiales excepto, por ejemplo: evitar temperaturas por encima de 45°C para los productos enlatados (latas en su estado normal) y ambientes húmedos para los productos en polvo.

6.5 Las latas hinchadas se deben refrigerar y enviarlas acondicionadas con mucho papel y material amortiguador y material refrigerante.

(Continúa)

6.6 Los productos perecederos no congelados se enfrían hasta 0 a 5°C, sea en un refrigerador o más rápidamente en un baño de hielo (en fundas plásticas) y se los envía en recipientes isotérmicos, cubiertos con una bandeja que contenga suficientes fundas plásticas con hielo picado o una mezcla de polialcoholes congelados, para mantener la temperatura de 0 a 5°C hasta su llegada al laboratorio. No utilizar hielo suelto ya que si el envase se revienta o tiene fugas puede contaminar el producto. Si se utiliza hielo seco, acondicionar la muestra de manera que no entre en contacto con el hielo para evitar su congelamiento.

6.7 Productos congelados, las muestras de estos productos se deben recoger en recipientes pre-enfriados y colocarlos inmediatamente en un congelador, o en hielo seco. Enviar al laboratorio en un recipiente isotérmico, o en caja de cartón, con nieve carbónica (dióxido de carbono sólido). Evitar que las muestras congeladas, tomadas en fundas plásticas, entren en contacto directo con el hielo seco porque el plástico se torna friable y puede romperse. Utilizar papel u otro material adecuado para proteger la muestra. Como control que la muestra no se ha descongelado durante el transporte, colocar dentro del paquete un recipiente con trocitos de hielo que deben estar intactos a la llegada del paquete con las muestras.

6.8 Indicar claramente sobre el paquete si la muestra es peresible o no, la temperatura a que debe mantenerse, refrigerada en hielo seco, si es frágil, etc.

6.9 Enviar las muestras juntamente con el informe de la toma (ver 5.1.4).

7. RECEPCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO.

7.1 Chequeo de las condiciones de las muestras. Al recibir las muestras se debe observar los siguientes aspectos:

7.1.1 Etiquetado e informe. Chequear si cada muestra está debidamente sellada, etiquetada y acompañada de una copia del respectivo informe de la toma de muestras (ver 5.1.2 y 5.1.4).

7.1.2 Estado de los envases. Chequear cuidadosamente si el envase tiene defectos, tales como: fisuras, perforaciones, fugas, deformaciones; fracturas y tapas flojas en los de plástico; perforaciones en fundas plásticas.

7.1.3 Control de la temperatura. Anotar la temperatura de las muestras perecederas no congeladas. Las muestras congeladas deben llegar al laboratorio en su estado congelado, controlar si no ha habido descongelamiento (ver 6.7). Las muestras frescas perecederas deben tener una temperatura entre 0 a 5°C. Anotar cualquier discrepancia en la hoja de registro.

7.1.4 Apego al programa de muestreo. Verificar que el número de las muestras de población está conforme con el programa de muestreo utilizado.

7.2 Almacenamiento de las muestras. Las muestras deben almacenarse protegidas de cualquier contaminación, de la luz solar directa o de otras fuentes de calor y a las temperaturas que se indican:

7.2.1 Productos congelados, a -20°C, máximo hasta siete días.

7.2.2 Productos perecederos no congelados, entre 0°C y 5°C, por no más de 24 horas.

7.2.3 Productos estables: enlatados, productos deshidratados, etc., a temperatura ambiente en lugares secos y frescos, hasta siete días.

7.2.4 Productos misceláneos: enjuagues, hisopos, aguas de efluentes, entre 0°C y 4°C, hasta 12 h.

(Continúa)

8. PREPARACIÓN DE LA UNIDAD DE MUESTRA PARA EL ANÁLISIS

8.1 Generalidades. Implica la preparación en el laboratorio de una submuestra de modo que sea tan representativa como sea posible de la muestra de población de la cual procede.

8.1.1 Si es posible, realizar los ensayos de las muestras luego después de la recepción en el laboratorio. Las muestras deben manipularse asépticamente y de preferencia sin interrupciones, si éstas son inevitables, deben ser lo más cortas posible y el producto se debe mantener en refrigeración durante este período.

8.1.2 Antes de manipular la muestra limpiar el área de trabajo y sus proximidades, e inmediatamente desinfectar el área con etanol al 70% o con cualquier otro desinfectante.

8.1.3 En muchos casos la unidad de muestreo, sin preparación adicional alguna, puede utilizarse como unidad de muestra. Si se necesita mezclar dos o más unidades de muestreo para formar la unidad de muestra, transferir las unidades de muestreo a un recipiente estéril suficientemente grande y mezclar bien.

8.1.4 Antes de abrir cualquier envase, sean éstos rígidos o semirígidos, limpiar externamente el envase con jabón o detergente y agua, secarlos con papel toalla y, en las proximidades de la tapa o en el área donde se va a abrir el envase flamear (con o sin etanol al 70% v/v evitando sobrecalentamientos) o aplicar una mezcla desinfectante que se le deja secar sin aplicar calor; sin embargo, cuando el envase o el material del embalaje es muy delgado y no resiste el proceso de limpieza omitir este paso y desinfectar con mucho cuidado. Cuando el envase puede removerse sin riesgo alguno de contaminar el producto, entonces, la limpieza y desinfección del envase no son necesarias. Todas las manipulaciones, durante y después de la abertura deben realizarse en condiciones tan asépticas como posible y de preferencia sin interrupciones; utilizar una cámara de flujo laminar vertical, si es posible. Durante cualquier interrupción se debe mantener el producto bajo refrigeración. El intervalo entre la agitación de la muestra y la remoción de la unidad analítica no debe ser mayor de tres minutos, y se debe tener cuidado para eliminar, incluso, cualquier espuma de la unidad analítica.

8.1.5 Abrir los envases de lata por la tapa no codificada, cuidando de no dañar el doble cierre.

8.1.6 Al tomar muestras de latas abombadas deben observarse las siguientes precauciones a fin de disminuir la salida violenta del contenido:

8.1.6.1 Abrir las latas abombadas en sitios especiales y NUNCA deben abrirse en áreas destinadas a pruebas de esterilidad.

8.1.6.2 Antes de abrir, refrigerar la lata lavada y seca.

8.1.6.3 Colocar la lata en una bandeja poco profunda que contenga una mezcla desinfectante, ver NTE INEN 1529.1. Si se sospecha la presencia de *Clostridium botulinum*, la bandeja debe contener una solución saturada de carbonato de sodio.

8.1.6.4 Desinfectar la lata frotando una mezcla desinfectante y dejando secarse, pero, NUNCA aplicando calor.

8.1.6.5 Para tapar la lata, utilizar un embudo de vidrio que tenga el vástago largo y firmemente taponado con algodón hidrófilo, a través del cual pasa un varilla de acero con su extremidad inferior afilada (todo el aparato debe estar envuelto, y esterilizado). Cubrir la lata con el embudo y sobre la tapa de ésta hacer descansar el extremo afilado de la varilla, y luego, cuidadosamente, golpear la varilla.

8.1.6.6 Abrir la lata después que la presión ha descendido, y según proceda, continuar con uno de los procedimientos indicados a continuación:

(Continúa)

8.2 Procedimiento

8.2.1 Líquidos

8.2.1.1 Si el espacio de cabeza es lo suficientemente grande, se debe mezclar el producto agitando el envase 25 veces en 10 segundos haciendo un arco de 300 mm. Se puede utilizar un homogeneizador estandarizado para asegurar una distribución uniforme de los microorganismos.

8.2.1.2 Si el espacio de cabeza es pequeño, mezclar el producto invirtiendo el envase 25 veces y luego:

- a) retirar una porción de líquido hasta que haya suficiente espacio de cabeza y entonces mezclar mediante agitación (ver 8.2.1.1); o
- b) transferir la muestra completa, o un parte de ella, a un envase estéril de tamaño adecuado y agitando mezclar bien (ver 8.2.1.1). En el caso de muestras líquidas con gas, incorporar unas perlas de vidrio estériles y agitar.

8.2.2 *Polvos.* Seguir los procedimientos indicados en 8.2.1.1 y 8.2.1.2 utilizando una espátula estéril.

8.2.3 *Productos congelados.* Si las muestras están congeladas, utilizar una de los siguientes procedimientos:

8.2.3.1 Descongelarlas parcialmente en su recipiente original cerrado (o en el que llegó al laboratorio), por no más de 24 h en un refrigerador entre 2°C y 5°C. Cuando se necesitan más de 24 h para descongelar las muestras, se pueden colocar en un baño de agua a una temperatura menor de 37°C y se les mantiene solo hasta que se fundan (máximo hasta 15 minutos, pero, la temperatura debe permanecer baja para evitar lesionar a los microorganismos) o, a temperatura ambiente por no más de 1 hora.

8.2.3.2 Si la muestra congelada puede picarse fácilmente, el descongelamiento no es necesario.

8.2.3.3 Con productos fácilmente descongelables (productos obtenidos con taladro, por ejemplo: jugos congelados, huevos congelados, etc.), se les descongela en un baño de agua o a temperatura ambiente, según se indica en 8.2.3.1.

8.2.3.4 Los helados se funden según se indica en el numeral 8.2.3.1 (si se encuentran en su envase original primero se los transfiere a un frasco estéril con tapa). Mezclar bien la muestra fundida.

8.2.4 *Mantequilla, margarinas y mantecas.*

8.2.4.1 Colocar la muestra de mantequilla en el refrigerador (4°C ± 1°C), hasta que se torne dura y se pueda cortar.

8.2.4.2 Con utensilios estériles, dividir la muestra de mantequilla, margarina o manteca en tres partes y del centro de cada una de estas superficies (no contaminadas) que quedan expuestas, pesar la unidad analítica en un frasco y añadir el diluyente (ver 4.3.11) a 32°C, en un volumen necesario para completar, juntamente con la fase acuosa, dos veces la unidad analítica, por ejemplo: las mantequillas y margarinas que tengan una humedad de 16%, pesar 25 g de muestra y añadir 46 cm³ de diluyente; si se pesan 50 g, añadir 92 cm³.

8.2.4.3 En el caso de las mantecas añadir un volumen igual a dos veces la muestra: 25 g de muestra y 50 cm³ diluyente.

8.2.4.4 Colocar el frasco en un baño de agua a no más de 45°C y, evitando un calentamiento excesivo, agitar hasta que la muestra y el diluyente se mezclen completamente.

(Continúa)

8.2.4.5 Conservar el frasco en el baño de agua hasta que la materia grasa se separe de la fase líquida. Utilizar esta fase líquida para las determinaciones microbiológicas: 2 cm³ de este líquido corresponden a 1 g de muestra y 0,2 cm³ a 0,1 g. Continuar el ensayo según lo indicado en 9.2.1.2

8.2.5 *Mayonesa.* Preparar la muestra según lo indicado en 8.2.4

8.2.6 *Carnes y otros productos.* Cuando por su naturaleza, el producto en análisis puede causar dificultades si se homogeneiza directamente, entonces, antes de manipular, asépticamente proceder según 8.2.6.1 y/o 8.2.6.2

8.2.6.1 *Picado.* Colocar el material en una superficie estéril, cortar en cubos de 1 cm³ y continuar según lo indicado en 8.2.6.2.

8.2.6.2 *Trituración.* Colocar el material (picado o no) en un frasco estéril, adicionar el exudado que hubiere, mezclar, homogeneizar dos veces y continuar según lo indicado en 9.2.2.

8.2.7 *Canales de aves y productos misceláneos.* Anotar el peso de la muestra, colocar la canal en una funda plástica estéril y lavar con 300 cm³ de agua peptonada al 0,1% friccionando la superficie de la muestra durante 30 segundos. Aplicar este procedimiento a frutas secas, cereales, legumbres y ensaladas, lavando con una cantidad de diluyente 10 veces el peso de la muestra. Si es necesario, continuar como se indica en 9.2.1.3

8.2.8 *Hisopos o torundas.* Al tubo que contiene el hisopo juntamente con el diluyente (ver 5.3.2.7 literal b.1) y 5.3.2.4), agitarlo vigorosamente, haciendo 50 ciclos completos de 15 cm en 10 segundos golpeando contra la palma de la otra mano, para desprender los microorganismos de la superficie del hisopo. La dispersión obtenida se puede diluir decimalmente. Si es necesario, continuar como se indica en 9.2.1.3.

8.2.9 *Productos formados por capas.* Si el alimento está formado por capas o extractos, examinar una porción de 10 g del paquete completo o, separadamente, preparar una suspensión inicial de cada una de estas partes, dependiendo del propósito del ensayo. Preparar como se indica en 9.2.2.

9. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN INICIAL O DILACIÓN PRIMARIA Y OTRAS DILUCIONES

9.1 Generalidades.

9.1.1 El tamaño de la unidad muestra generalmente es 10 g ó 10 cm³ o un múltiplo de 10 y, debe ser tal, que permita realizar todos los ensayos requeridos.

9.1.2 Para la detección de *Salmonella*, en general, preparar la suspensión inicial con una unidad de muestra de 25 g (cm³) y 225 cm³ del diluyente indicado en la NTE INEN 1529-15. Si la unidad de muestra prescrita difiere de 25 g, utilizar la cantidad necesaria de diluyente para obtener una dilución de aproximadamente 1/10 (masa/volumen). Ver nota 5.

NOTA 5 Con el objeto de reducir la sobrecarga de trabajo en el laboratorio, y cuando hay evidencias de que la mixtura de dos o más unidades de muestra no afecta el resultado para aquel alimento particular, existe la alternativa de preparar unidades de muestra compuesta. El tamaño máximo de una unidad de muestra compuesta es de 375 g (15 unidades de muestra de 25 g). Por ejemplo, si es necesario analizar 10 unidades de muestra de 25 g, se mezclan las 10 unidades para formar una unidad de muestra compuesta de 250 g y se adicionan 2,25 litros del diluyente, ver NTE INEN 1529-15. Alternativamente, se puede preparar una muestra compuesta transfiriendo alícuotas de 0,1 cm³ de cada uno de los 10 cultivos de pre-enriquecimiento a un frasco que contenga 100 cm³ de caldo RV, o alícuotas de 10 cm³ a un frasco que contenga 1 litro de caldo selenito cistina o caldo tetratonato.

(Continúa)

9.1.3 Mezclar la unidad de muestra o porción de ensayo con un volumen de diluyente igual a nueve veces el peso de la unidad analítica. Si se obtiene una suspensión inicial demasiado viscosa o espesa adicionar más diluyente. Esto se debe tener en cuenta para las operaciones subsiguientes y/o expresión de resultados.

9.1.4 Para evitar lesionar a los microorganismos por cambios súbitos de la temperatura, la temperatura de los diluyentes debe ser aproximadamente la misma de la muestra, a menos que haya otra indicación.

9.1.5 La preparación de la suspensión inicial de algunos tipos de productos necesitan de cuidados especiales, tales como:

9.1.5.1 Calentar a temperaturas inferiores a 45°C por no más de 15 minutos productos como el cacao en polvo, gelatina, productos en polvo, mantecas, mantequillas. Para los quesos utilizar el diluyente a 44°C ± 1°C.

9.1.5.2 Neutralizar los alimentos ácidos con una solución estéril de fosfato tripotásico al 8%, antes de preparar la suspensión inicial.

9.1.5.3 Reconstituir los productos deshidratados y revitalizar a los microorganismos lesionados por los procesos de elaboración y almacenamiento de los productos alimenticios.

9.1.5.4 Para productos grasosos o pulverulentos que forman grumos adicionar al diluyente un agente humectante tal como el "Tergitol Aniónico 7" (1% m/v).

9.1.5.5 Cuando se va a realizar recuento de esporos, a la suspensión inicial, inmediatamente después de preparada, someterla a un tratamiento térmico (por ejemplo, 80°C por 10 minutos) seguido de un enfriamiento rápido en un baño de agua helada.

9.2 Suspensión inicial o dilución primaria (10^{-1})

9.2.1 *Líquidos*: Productos líquidos no viscosos (agua, leche, jugos, enjuagues, etc.) en los cuales los microorganismos se distribuyen homogéneamente o que fácilmente se los puede homogeneizar por medios mecánicos; fase líquida de mezclas heterogéneas que se considera que es lo suficientemente representativa de la muestra en conjunto (fase líquida de las grasa vegetales o animales) y productos líquidos viscosos.

9.2.1.1 Líquidos no viscosos, con una pipeta estéril transferir 10 cm³ a un frasco y añadir 90 cm³ de diluyente. Mezclar cuidadosamente esta solución agitando el frasco 25 veces en 10 segundos haciendo un arco de 300 mm, o aspirando 10 veces con una pipeta estéril, o utilizando un homogeneizador tipo "vortex" por 5 a 10 segundos. Seleccionar la velocidad de tal manera para que el líquido, en torbellino, suba hasta 2 o 3 cm del borde del vaso. Si se requieren otras diluciones, continuar según lo indicado en 9.3.

9.2.1.2 De las mantequillas y mantecas, de la fase líquida (ver 8.2.4.5) tomar 2 cm³ y añadir 8 cm³ de diluyente, se obtiene la dilución 10^{-1} . Para otras diluciones, continuar según lo indicado en 9.3.

9.2.1.3 Enjuagues, la solución de enjuague obtenida en los numerales 8.2.7 y 8.2.8 constituye la dilución primaria, siempre que, para el enjuague se utilice el volumen adecuado de diluyente (ver 5.3.2.7 literal b.1). Para otras diluciones, continuar como se indica en 9.3.

9.2.1.4 De los líquidos viscosos y helados fundidos (ver 8.2.3.4) pesar 10 g de muestra en 90 cm³ de diluyente y mezclar bien mediante agitación (para pesar, se puede utilizar una cuchara o una pipeta, dependiendo de la consistencia de la muestra). Para otras diluciones continuar según lo indicado en 9.3.

(Continúa)

9.2.2 *Productos sólidos.* (Ver notas 6)

9.2.2.1 Pesar con una precisión de 0,1 g en un frasco (si se utiliza homogeneizador rotatorio), o en una funda plástica (si se utiliza "stomacher") 10 g (o un múltiplo de 10 g) de la muestra de población o de la submuestra preparada. Añadir 90 cm³ de diluyente (o múltiplo de 90) a la temperatura adecuada (dilución 10⁻¹).

9.2.2.2 Hacer funcionar el homogeneizador a baja velocidad y en pocos segundos pasar a la velocidad entre 15 000 a 20 000 rpm. Cuidar escrupulosamente que el tiempo de homogeneización a alta velocidad no exceda los dos minutos. Para productos blandos o que forman mucha espuma es suficiente un minuto.

9.2.2.3 Hacer funcionar el "stomacher" 1 ó 2 minutos, según la naturaleza del producto (ver nota 6.2).

9.2.2.4 Si es necesario, dejar en reposo hasta 15 minutos para que las partículas grandes se sedimenten. Para preparar otras diluciones utilizar la capa superficial y si hay una capa de grasa, tomar de la parte acuosa.

9.3 *Otras diluciones.* (Ver nota 7)

9.3.1 Si la dilución primaria se homogeneizó con pipeta, utilizar la misma pipeta para transferir 1 cm³ de la suspensión inicial (dilución 10⁻¹) a otro tubo que contenga 9 cm³ de diluyente estéril a la temperatura adecuada, evitar que la pipeta entre en contacto con el diluyente y con otra pipeta estéril mezclar cuidadosamente. De esta manera se obtiene la dilución 10⁻².

9.3.2 Si es necesario, repetir lo indicado en el numeral 9.3.1 para la dilución 10⁻³ y siguientes diluciones, hasta obtener el número necesario de diluciones y alcanzar el número adecuado de microorganismos por cm³. Cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración.

9.4 Duración del procedimiento. El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y la mezcla de las diluciones con el medio de cultivo (descrito en el método específico de ensayo) no debe ser mayor que 45 minutos. El tiempo transcurrido entre la preparación de la suspensión inicial y el inicio de la preparación de las siguientes diluciones no debe exceder los 30 minutos.

9.5 *Revitalización*

9.5.1 Los microorganismos presentes en los alimentos pueden estar lesionados o debilitados debido a los tratamientos que se utilizan en el procesado de alimentos. Entre los tratamientos que lesionan a los microorganismos tenemos el calor, frío, desecación, liofilización, congelación, baja actividad de agua e irradiación. Los tratamientos químicos adversos como carencia de nutrientes, pH bajo, preservantes y exposición a desinfectantes.

NOTAS 6:

6.1 Con algunos productos no es aconsejable utilizar el "stomacher" (por ejemplo, los que tienen elementos puntiagudos o cortantes, o aquellos que no se disgregan fácilmente), pudiéndose utilizar siempre que haya evidencia (datos publicados o ensayos comparativos) que los resultados obtenidos no difieren significativamente de los obtenidos con un homogeneizador rotatorio.

6.2 Prestar atención al hecho que para determinados productos, en especial cereales, los tiempos de 1 y 2 minutos no son adecuados para microorganismos tales como los mohos y levaduras. En este caso el "stomacher" permite una mejor recuperación que el homogeneizador rotatorio. Hacer funcionar el "stomacher" por 10 minutos evitando separaciones, ya que se pueden perder algunos mohos y levaduras del líquido sobrenadante.

NOTA 7 Para las pruebas de presencia o ausencia de microorganismos en 0,1 cm³ ó 0,1 g de producto, no se necesita preparar las siguientes diluciones.

(Continúa)

9.5.2 El número de microorganismos que son detectados en los diferentes medios depende de la severidad y duración de las condiciones adversas, tipo de microorganismos presentes y la composición del medio utilizado, especialmente si es selectivo.

9.5.3 Cuando es necesario, los procedimientos de revitalización están incluidos en las secciones pertinentes de las NTE INEN 1529.

(Continúa)

APÉNDICE Z

Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529.5:1990 *Control Microbiológico de los Alimentos. Determinación del número de microorganismos aeróbios mesófilos REP*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529.6:1990 *Control Microbiológico de los Alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del Número Más Probable.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529.7:1990 *Control Microbiológico de los Alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica de recuento de colonias.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529.8:1990 *Control Microbiológico de los Alimentos. Determinación de coliformes fecales y **Escherichia coli.***
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529.9:1990 *Control Microbiológico de los Alimentos. Determinación de la presencia o ausencia de coliformes (utilizando medio líquido).*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529.10:1998 *Control Microbiológico de los Alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuento en placa por siembra en profundidad.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529.11:1998 *Control Microbiológico de los Alimentos. Mohos y levaduras viables. Detección.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529.13:1998 *Control Microbiológico de los Alimentos. **Enterobacteriaceae.** Recuento en placa por siembra en profundidad.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529.14:1998 *Control Microbiológico de los Alimentos. **Staphylococcus aureus.** Recuento en placa de siembra por extensión en superficie.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529.15:1996 *Control Microbiológico de los Alimentos. **Salmonella.** Método de detección.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529.16:1996 *Control Microbiológico de los Alimentos. **Shigella.** Método de detección.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529.17:1998 *Control Microbiológico de los Alimentos. Bacterias anaerobias mesófilas. Recuento en tubo por siembra en masa.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529.18:1998 *Control Microbiológico de los Alimentos. **Clostridium perfringens.** Recuento en tubo por siembra en masa.*
- Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529.19:1996 *Control Microbiológico de los Alimentos. Microorganismos osmófilos. Recuento en placa por siembra en profundidad*

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Norma Internacional ISO 6579: 1993(E) *MICROBIOLOGY - GENERAL GUIDANCE ON METHODS FOR THE DETECTION OF Salmonella.* International Organization for Standardization. Switzerland, 1993.

Norma Británica BS 5348 Part 1: 1991 ISO 3100-1: 1991 *METHODS FOR SAMPLING MEAT AND MEAT PRODUCTS Part 1. Taking primary samples.* British Standards. London, 1991.

(Continúa)

Norma Británica BS 4285: Section 1.1: 1991 *MICROBIOLOGICAL EXAMINATION FOR DAIRY PURPOSES. Part 1. Guide to general procedures. Section 1.1 Sampling and preparation of samples.* British Standards. London, 1991.

Norma Internacional ISO 8261: 1989 *MILK AND MILK PRODUCTS -PREPARATION OF TEST SAMPLES AND DILUTIONS FOR MICROBIOLOGICAL EXAMINATION.* International Organization for Standardization. Switzerland, 1989.

Norma Internacional ISO 3100-2: 1988 *MEAT AND MEAT PRODUCTS -SAMPLING AND PREPARATION OF TEST SAMPLES. Part 2: Preparation of test samples for microbiological examination.* International Organization for Standardization. Switzerland, 1988.

Norma Británica BS 809: 1985 ISO 707-1985 *British Standard Methods for SAMPLING OF MILK AND MILK PRODUCTS.* British Standards Institution. London, 1985.

Norma Británica BS 5763:Part 6:1983 ISO 6887-1983 *British Standard Methods for MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOOD AND ANIMAL FEEDING STUFFS. Part 6. Preparation of dilutions.* British Standards Institution. London, 1983.

APHA. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods.* Third edition. Splittstoesser Don F., Vanderzant Carl. Washington - DC, 1992.

ICMSF. "Microorganismos de los Alimentos 1. Técnicas del análisis microbiológico". Acribia. Zaragoza - España.

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Documento: NTE INEN 1 529-2	TÍTULO: CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. TOMA, ENVÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.	Código: AL 01.05-318
--	--	--------------------------------

ORIGINAL: Fecha de iniciación del estudio: 1995-10	REVISIÓN: Fecha de aprobación anterior por Consejo Directivo Oficialización con el Carácter de por Acuerdo No. de publicado en el Registro Oficial No. de Fecha de iniciación del estudio:
---	--

Fechas de consulta pública: de 1997-05-22 a 1997-08-25

Comité Interno del INEN:
Fecha de iniciación: 1997-10-17 Fecha de aprobación: 1998-03-17
Integrantes del Subcomité Técnico:

NOMBRES:

Dr. Ramiro Gallegos (Presidente)
Dr. Hugo Ayala

Ing. Bolívar Cano
Ing. Enrique Troya

Bioq. Flor Elena Salazar
Dra. Hipatia Navas (Secretaria Técnica)

INSTITUCIÓN REPRESENTADA:

SUBDIRECTOR TECNICO
DIRECCION DE DESARROLLO Y
CERTIFICACION DE CALIDAD
DIRECCION DE NORMALIZACION
DIRECTOR DE PROTECCION AL
CONSUMIDOR
DIRECCION DE VERIFICACION FISICA
DIRECCION DE VERIFICACION ANALITICA

Otros trámites:

CARÁCTER: Se recomienda su aprobación como: VOLUNTARIA

Aprobación por Consejo Directivo en sesión de 1998-11-12 como: Voluntaria	Oficializada como: VOLUNTARIA Por Acuerdo Ministerial No. 990025 de 1999-02-03 Registro Oficial No. 133 de 1999-02-22
---	---

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891 - Fax: (593 2) 2 567815
Dirección General: E-Mail: furresta@inen.gov.ec
Área Técnica de Normalización: E-Mail: normalizacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Certificación: E-Mail: certificacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Verificación: E-Mail: verificacion@inen.gov.ec
Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: inencati@inen.gov.ec
Regional Guayas: E-Mail: inenquayas@inen.gov.ec
Regional Azuay: E-Mail: inencuenca@inen.gov.ec
Regional Chimborazo: E-Mail: inenriobamba@inen.gov.ec
[URL:www.inen.gov.ec](http://www.inen.gov.ec)