

Febrero 2008

### TÍTULO

**Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal**

**Requisitos generales y guía para el examen microbiológico**

(ISO 7218:2007)

*Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations. (ISO 7218:2007).*

*Microbiologie des aliments. Exigences générales et recommandations. (ISO 7218:2007).*

### CORRESPONDENCIA

Esta norma es la versión oficial, en español, de la Norma Europea EN ISO 7218:2007, que a su vez adopta la Norma Internacional ISO 7218:2007.

### OBSERVACIONES

### ANTECEDENTES

Esta norma ha sido elaborada por el comité técnico AEN/CTN 34 *Productos Alimentarios* cuya Secretaría desempeña FIAB.



ICS 07.100.30

Versión en español

**Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal**  
**Requisitos generales y guía para el examen microbiológico**  
**(ISO 7218:2007)**

**Microbiology of food and animal feeding  
stuffs. General requirements and guidance  
for microbiological examinations.**  
**(ISO 7218:2007).**

**Microbiologie des aliments. Exigences  
générales et recommandations.**  
**(ISO 7218:2007).**

**Mikrobiologie von Lebensmitteln und  
Futtermitteln. Allgemeine Anforderungen  
und Anleitung für mikrobiologische  
Untersuchungen. (ISO 7218:2007).**

Esta norma europea ha sido aprobada por CEN el 2007-04-19.

Los miembros de CEN están sometidos al Reglamento Interior de CEN/CENELEC que define las condiciones dentro de las cuales debe adoptarse, sin modificación, la norma europea como norma nacional. Las correspondientes listas actualizadas y las referencias bibliográficas relativas a estas normas nacionales pueden obtenerse en el Centro de Gestión de CEN, o a través de sus miembros.

Esta norma europea existe en tres versiones oficiales (alemán, francés e inglés). Una versión en otra lengua realizada bajo la responsabilidad de un miembro de CEN en su idioma nacional, y notificada al Centro de Gestión, tiene el mismo rango que aquéllas.

Los miembros de CEN son los organismos nacionales de normalización de los países siguientes: Alemania, Austria, Bélgica, Bulgaria, Chipre, Dinamarca, Eslovaquia, Eslovenia, España, Estonia, Finlandia, Francia, Grecia, Hungría, Irlanda, Islandia, Italia, Letonia, Lituania, Luxemburgo, Malta, Noruega, Países Bajos, Polonia, Portugal, Reino Unido, República Checa, Rumanía, Suecia y Suiza.

**CEN**  
**COMITÉ EUROPEO DE NORMALIZACIÓN**  
European Committee for Standardization  
Comité Européen de Normalisation  
Europäisches Komitee für Normung  
**CENTRO DE GESTIÓN: Rue de Stassart, 36 B-1050 Bruxelles**

## PRÓLOGO

El texto de la Norma Europea EN ISO 7218:2007 ha sido elaborado por el Comité Técnico ISO/TC 34 *Productos agrícolas alimenticios* en colaboración con el Comité Técnico CEN/TC 275 *Análisis de los productos alimenticios. Métodos horizontales*, cuya Secretaría está desempeñada por DIN.

Esta norma europea debe recibir el rango de norma nacional mediante la publicación de un texto idéntico a ella o mediante ratificación antes de finales de febrero de 2008, y todas las normas nacionales técnicamente divergentes deben anularse antes de finales de febrero de 2008.

De acuerdo con el Reglamento Interior de CEN/CENELEC, están obligados a adoptar esta norma europea los organismos de normalización de los siguientes países: Alemania, Austria, Bélgica, Bulgaria, Chipre, Dinamarca, Eslovaquia, Eslovenia, España, Estonia, Finlandia, Francia, Grecia, Hungría, Irlanda, Islandia, Italia, Letonia, Lituania, Luxemburgo, Malta, Noruega, Países Bajos, Polonia, Portugal, Reino Unido, República Checa, Rumanía, Suecia y Suiza.

## DECLARACIÓN

El texto de la Norma Internacional ISO 7218:2007 ha sido aprobado por CEN como Norma Europea EN ISO 7218:2007 sin ninguna modificación.

## ÍNDICE

	Página
PRÓLOGO .....	8
INTRODUCCIÓN .....	9
<b>1 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>2 NORMAS PARA CONSULTA.....</b>	<b>10</b>
<b>3 INSTALACIONES.....</b>	<b>10</b>
3.1 Generalidades .....	10
3.2 Consideraciones de seguridad .....	11
3.3 Diseño del laboratorio.....	11
3.4 Áreas del laboratorio .....	11
3.5 Distribución y características de los edificios .....	12
3.6 Limpieza y desinfección .....	14
<b>4 PERSONAL.....</b>	<b>14</b>
4.1 Generalidades .....	14
4.2 Competencia .....	14
4.3 Verificación del nivel de competencia del personal a lo largo del tiempo .....	14
4.4 Higiene .....	14
<b>5 APARATOS Y EQUIPAMIENTO.....</b>	<b>15</b>
5.1 Generalidades.....	15
5.2 Cabinas de protección.....	16
5.3 Balanzas y diluidores gravimétricos .....	17
5.4 Homogeneizadores, trituradoras y mezcladoras .....	18
5.5 pH-metro.....	19
5.6 Autoclave.....	20
5.7 Preparador de medios.....	21
5.8 Incubador.....	21
5.9 Neveras, cámaras de refrigeración .....	22
5.10 Congeladores y ultracongeladores.....	23
5.11 Baño termostático.....	24
5.12 Vaporizadores, incluidos los baños de agua en ebullición .....	25
5.13 Horno de esterilización .....	25
5.14 Horno microondas.....	26
5.15 Lavavajillas para material de vidrio .....	27
5.16 Microscopios ópticos.....	28
5.17 Mecheros de gas o incineradores de agujas .....	28
5.18 Dispensadores de reactivos y medios de cultivo.....	29
5.19 Mezclador tipo vórtex .....	29
5.20 Contador de colonias.....	30
5.21 Equipamiento para cultivo en atmósfera modificada .....	30
5.22 Centrifuga .....	31
5.23 Placa calefactora y manta eléctrica .....	31
5.24 Sembrador espiral.....	32
5.25 Destiladores, desionizadores y unidades de ósmosis inversa .....	33
5.26 Temporizadores y dispositivos de control del tiempo .....	33
5.27 Pipetas y pipeteadores.....	34
5.28 Termómetros y sistemas de control de la temperatura, incluyendo los registradores automáticos .....	34

5.29	Separador inmunomagnético .....	36
5.30	Sistema de filtración.....	36
5.31	Otros equipos y programas informáticos.....	36
6	<b>PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO Y DEL RESTO DEL MATERIAL DE LABORATORIO.....</b>	<b>36</b>
6.1	Preparación.....	36
6.2	Esterilización/descontaminación.....	37
6.3	Equipamiento y materiales desechables .....	37
6.4	Almacenamiento del material de vidrio y del resto del material de laboratorio limpio.....	37
6.5	Mantenimiento del material de vidrio y del resto del material de laboratorio estéril.....	37
6.6	Descontaminación y desinfección.....	38
6.7	Tratamiento de residuos .....	38
6.8	Lavado.....	39
7	<b>PREPARACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO .....</b>	<b>39</b>
8	<b>MUESTRAS DE LABORATORIO.....</b>	<b>39</b>
8.1	Toma de muestras .....	39
8.2	Transporte .....	39
8.3	Recepción .....	40
8.4	Almacenamiento.....	41
8.5	Porción para análisis.....	41
9	<b>ANÁLISIS.....</b>	<b>41</b>
9.1	Precauciones de carácter higiénico durante los análisis .....	41
9.2	Preparación de las suspensión inicial y de las diluciones.....	43
10	<b>RECuento .....</b>	<b>43</b>
10.1	Generalidades .....	43
10.2	Recuento en medio sólido .....	44
10.3	Cálculo y expresión de los resultados obtenidos con los medios sólidos .....	46
10.4	Recuento de levaduras y mohos .....	52
10.5	Recuento mediante el uso de un medio líquido.....	52
11	<b>MÉTODO DE DETECCIÓN (MÉTODO CUALITATIVO).....</b>	<b>58</b>
11.1	Generalidades.....	58
11.2	Principio.....	58
11.3	Medida de la incertidumbre.....	59
12	<b>MÉTODOS DE CONFIRMACIÓN .....</b>	<b>59</b>
12.1	Generalidades.....	59
12.2	Preparación de un cultivo puro.....	59
12.3	Tinción de Gram (técnica de Hucker modificada).....	59
12.4	Uso de galerías bioquímicas para la identificación .....	61
12.5	Uso de sondas de ácidos nucleicos para la identificación.....	61
12.6	Métodos serológicos .....	61
13	<b>INFORME DEL ANÁLISIS .....</b>	<b>62</b>
14	<b>VALIDACIÓN DE LSO MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS.....</b>	<b>62</b>
14.1	Validación de los métodos de referencia .....	62
14.2	Validación de los métodos alternativos .....	62
14.3	Validación de los métodos internos.....	63

<b>15</b>	<b>VALORACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS/CONTROL DE CALIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DEL MÉTODO .....</b>	<b>63</b>
<b>15.1</b>	<b>Control interno de la calidad.....</b>	<b>63</b>
<b>15.2</b>	<b>Cepas de referencia .....</b>	<b>63</b>
<b>15.3</b>	<b>Valoración externa de la calidad (ejercicios interlaboratorios) .....</b>	<b>63</b>
	<b>ANEXO A (Informativo) PROPIEDADES DE ALGUNOS DESINFECTANTES.....</b>	<b>64</b>
	<b>ANEXO B (Normativo) DETERMINACIÓN DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)...</b>	<b>65</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>72</b>

## PRÓLOGO

ISO (la Organización Internacional de Normalización) es una federación mundial de organismos nacionales de normalización (organismos miembros de ISO). El trabajo de preparación de las normas internacionales normalmente se realiza a través de los comités técnicos de ISO. Cada organismo miembro interesado en una materia para la cual se haya establecido un comité técnico, tiene el derecho de estar representado en dicho comité. Las organizaciones internacionales, públicas y privadas, en coordinación con ISO, también participan en el trabajo. ISO colabora estrechamente con la Comisión Electrotécnica Internacional (IEC) en todas las materias de normalización electrotécnica.

Las normas internacionales se redactan de acuerdo con las reglas establecidas en la Parte 2 de las Directivas ISO/IEC.

La tarea principal de los comités técnicos es preparar normas internacionales. Los proyectos de normas internacionales adoptados por los comités técnicos se envían a los organismos miembros para su votación. La publicación como norma internacional requiere la aprobación por al menos el 75% de los organismos miembros con derecho a voto.

Se llama la atención sobre la posibilidad de que algunos de los elementos de esta norma internacional puedan estar sujetos a derechos de patente. ISO no asume la responsabilidad por la identificación de cualquiera o todos los derechos de patente.

La Norma Internacional ISO 7218 fue preparada por el Comité Técnico ISO/TC 34 *Productos agrícolas alimenticios*, Subcomité SC 9, *Microbiología*, en colaboración con el Comité Técnico CEN/TC 275, *Análisis de los productos alimenticios. Métodos horizontales*.

Esta tercera edición anula y sustituye a la segunda edición (ISO 7218:1996), que ha sido revisada técnicamente. También incorpora la Modificación ISO 7218:1996/Amd 1:2001.



## INTRODUCCIÓN

Cuando se realizan análisis microbiológicos, es especialmente importante que:

- sólo se aislen y se recuenten aquellos microorganismos presentes en las muestras;
- los microorganismos no contaminen el medio ambiente.

Para conseguir estos objetivos, es necesario prestar atención a las medidas de higiene personal, y emplear técnicas de trabajo que aseguren, en la medida de lo posible, la ausencia de contaminaciones de origen externo.

Por lo tanto, en esta norma internacional, solamente se pueden proporcionar algunos ejemplos sobre las precauciones que deben adoptarse durante los análisis microbiológicos, y es esencial poseer un conocimiento detallado de las técnicas microbiológicas y sobre los microorganismos estudiados. Es importante que los análisis se realicen de la manera más exacta posible, incluyendo el seguimiento y el registro de todos aquellos aspectos que pudieran afectar a los resultados y al cálculo del número de microorganismos, y a la incertidumbre de los resultados.

Finalmente, es responsabilidad del director del laboratorio considerar si las manipulaciones son seguras y si se pueden considerar como buenas prácticas de laboratorio.

Por ejemplo, muchas manipulaciones pueden causar contaminaciones cruzadas de forma no intencionada. El analista debería verificar siempre la precisión de los resultados obtenidos con su técnica.

Es necesario tomar algunas precauciones cuando se construye y equipa el laboratorio, para que la realización de los análisis sea la correcta.

Deben tomarse algunas precauciones, no solamente por razones de higiene sino también para asegurar una buena reproducibilidad de los resultados. No se pueden especificar todas las precauciones que deben tomarse en todas las posibles circunstancias, pero esta norma internacional establece al menos las principales medidas que se deben tomar para preparar, esterilizar y almacenar los medios y utilizar el equipamiento.

Si se siguen las orientaciones indicadas en esta norma internacional, se contribuirá también al mantenimiento de la salud y la seguridad del personal. Se puede encontrar información adicional sobre este tema en las referencias dadas en el apartado de bibliografía.

Para distinguir la guía orientativa dentro de esta norma internacional, se ha impreso en un tipo de letra distinto (Arial).

## 1 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma internacional indica los requisitos generales y ofrece unas opciones/una guía orientativa con tres objetivos principales:

- implementación de las Normas del Subcomité ISO/TC 34/SC 9 o del Subcomité ISO/TC 34/SC 5 para la detección o el recuento de microorganismos, denominadas de aquí en adelante “normas específicas”;
- las buenas prácticas de laboratorio en los laboratorios de microbiología de los alimentos (no es propósito de esta norma internacional detallar dichas prácticas; existen manuales disponibles para ello);
- una guía orientativa para la acreditación de los laboratorios de microbiología de los alimentos (esta norma internacional describe los requisitos técnicos para la acreditación de un laboratorio de microbiología por parte de las organizaciones nacionales conforme al anexo B de la Norma ISO/IEC 17025:2005).

Los requisitos de esta norma internacional anulan y sustituyen a los de las normas específicas existentes.

En la Norma ISO 22174 se ofrecen indicaciones adicionales sobre los análisis dentro del campo de la biología molecular.

Esta norma internacional abarca el análisis de bacterias, levaduras y mohos, y, si se completa con una guía orientativa específica, puede ampliarse a priones, parásitos y virus. No cubre el análisis de toxinas o de otros metabolitos (por ejemplo aminas) de los microorganismos.

Esta norma internacional afecta a la microbiología de los alimentos, la alimentación animal, y las muestras ambientales procedentes de la producción de alimentos y la producción primaria.

El objeto de esta norma internacional es ayudar a asegurar la validez de los análisis microbiológicos de los alimentos, colaborar a que se asegure que las técnicas generales que se utilizan para realizar dichos análisis sean las mismas en todos los laboratorios, ayudar a conseguir unos resultados homogéneos en todos los laboratorios y contribuir a la seguridad del personal del laboratorio previniendo los riesgos de que se produzcan infecciones.

## 2 NORMAS PARA CONSULTA

Las normas que a continuación se indican son indispensables para la aplicación de esta norma. Para las referencias con fecha, sólo se aplica la edición citada. Para las referencias sin fecha se aplica la última edición de la norma (incluyendo cualquier modificación de ésta).

ISO 835 (todas sus partes) *Material de vidrio de laboratorio. Pipetas graduadas.*

ISO 6887 (todas sus partes) *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico.*

ISO 8199 *Calidad del agua. Orientaciones generales para el recuento de microorganismos en cultivo*

ISO 8261 *Leche y productos lácteos. Directrices generales para la preparación de muestras para análisis, suspensiones iniciales y diluciones decimales para el análisis microbiológico.*

ISO 8655-1 *Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 1: Terminología, requisitos generales y recomendaciones de uso.*

ISO/TS 11133 (todas las partes) *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Guía para la preparación y producción de medios de cultivo.*

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

ISO/TS 19036 *Microbiología de los alimentos y de los productos alimenticios para animales. Guía orientativa para la estimación de la incertidumbre en las medidas de las determinaciones cuantitativas.*

ISO 22174 *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos generales y definiciones.*

## 3 INSTALACIONES

### 3.1 Generalidades

Este capítulo trata sobre los requisitos generales, es decir, los principios básicos de diseño y organización en la distribución de un laboratorio de microbiología.

El análisis de las muestras procedentes de producción primaria (especialmente las relacionadas con la recepción de muestras y la preparación de muestras) debe separarse del análisis del resto de las muestras, para reducir el riesgo de contaminación cruzada.

### 3.2 Consideraciones de seguridad

El diseño del laboratorio debe cumplir ciertos requisitos de seguridad, que dependerán del tipo de microorganismo. Con esta finalidad, los microorganismos se clasifican en cuatro niveles de seguridad:

- **Nivel de seguridad 1** (riesgo nulo o muy bajo para el individuo y para la comunidad).

Microorganismos con baja probabilidad de causar enfermedades humanas o animales.

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

Un patógeno que puede causar una enfermedad humana o animal, pero que tiene una baja probabilidad de suponer una amenaza seria para los trabajadores del laboratorio, la comunidad o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede causar una infección humana grave, pero existen medidas preventivas y tratamientos eficaces que hacen que el riesgo de propagación de la infección sea limitado.

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

Un patógeno que suele causar enfermedades humanas o animales graves, pero que generalmente no se propaga de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y tratamientos eficaces.

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

Un patógeno que suele causar enfermedades humanas o animales graves, y que se puede propagar fácilmente de un individuo a otro, por una vía directa o indirecta. Por lo general, no existen medidas preventivas ni tratamientos eficaces.

**ADVERTENCIA – Se deben consultar las normativas nacionales que van a definir de forma concreta los niveles de seguridad de los microorganismos localizados dentro de los límites de cada país.**

### 3.3 Diseño del laboratorio

La guía orientativa sobre la distribución del laboratorio descrita a continuación se refiere a la detección de los microorganismos pertenecientes a los niveles de seguridad 1, 2 y 3 para microbiología de los alimentos.

Debería advertirse que puede ser necesario adoptar medidas de seguridad adicionales, dependiendo de la legislación local.

### 3.4 Áreas del laboratorio

#### 3.4.1 Generalidades

El laboratorio incluye áreas destinadas a las muestras y a los análisis (véase el apartado 3.4.2) y áreas generales (véase el apartado 3.4.3). Dichas áreas deben estar separadas.

#### 3.4.2 Áreas destinadas a las muestras y a los análisis

Se considera una buena práctica de laboratorio disponer de localizaciones separadas, o de áreas claramente destinadas a las siguientes funciones:

- recepción y almacenamiento de las muestras;
- preparación de las muestras, en particular para el caso de materias primas (por ejemplo productos pulverizados que contienen un alto número de microorganismos);
- examen de las muestras (a partir de la suspensión inicial), incluyendo la incubación de los microorganismos;
- manipulación de los posibles patógenos;

- almacenamiento de las cepas de referencias y de otras cepas;
- preparación y esterilización de los medios de cultivo y del equipamiento;
- almacenamiento de los reactivos y los medios de cultivo;
- análisis de la esterilidad de los productos alimenticios;
- descontaminación;
- lavado del material de vidrio y del resto de equipamiento;
- almacenamiento de los productos químicos peligrosos, preferiblemente mantenidos en edificios, habitaciones, armarios o cabinas especialmente diseñados.

### 3.4.3 Áreas generales

Debería considerarse disponer de áreas separadas para lo siguiente:

- entradas, pasillos, escaleras, ascensores;
- áreas administrativas (por ejemplo secretaría, oficinas, salas de documentación, etc.);
- vestuario y aseos;
- salas de archivos;
- almacenes;
- salas de descanso.

## 3.5 Distribución y características de los edificios

### 3.5.1 Objetivos

El objetivo es asegurar que el ambiente en el que se realizan los análisis microbiológicos no afecta a la fiabilidad de los resultados de los análisis.

Las instalaciones se diseñan para evitar el riesgo de contaminación cruzada. Algunas formas de alcanzar este objetivo son por ejemplo:

- a) construir el laboratorio bajo el principio de distribución de “no retorno”;
- b) realizar los procedimientos de manera secuencial adoptando las precauciones necesarias para asegurar la integridad de la muestras y del análisis (por ejemplo utilizando recipientes sellados);
- c) separar las actividades en el tiempo o en el espacio.

Se evitan las condiciones extremas, tales como un exceso 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 requerido debería ser proporcional al volumen de análisis realizados y a la organización general interna del laboratorio. 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 (consúltense 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 suelos deberían ser lisos, fáciles de limpiar y resistentes a los detergentes y a los desinfectantes utilizados en los laboratorios.
- b) Los suelos deberían ser antideslizantes.
- c) Las tuberías elevadas que transportan líquidos no deberían cruzar las salas a no ser que estén aisladas herméticamente. Todas las demás estructuras elevadas deberían estar recubiertas o ser de fácil acceso para su limpieza normal.
- d) Las puertas y ventanas deberían poderse cerrar cuando se realicen los análisis para minimizar las corrientes de aire. Además, deberían estar diseñadas para evitar la formación de acúmulos de polvo, facilitando la limpieza. La temperatura ambiente (entre 18 °C y 27 °C) y la calidad del aire (contenido de microorganismos, velocidad de propagación del polvo, etc.) deberían ser compatibles con la realización de los análisis. Se recomienda utilizar un sistema de ventilación de aire filtrado para el aire de entrada y el aire de salida con este objetivo.
- e) Debería instalarse un sistema de extracción adecuado para prevenir la exposición al polvo que se produce al manipular los medios de cultivo deshidratados y el procedente de las muestras pulverizadas.
- f) Cuando los análisis deban realizarse en una atmósfera de baja contaminación, la sala debería estar especialmente equipada con una cabina de flujo laminar y/o una cabina de seguridad.
- g) En caso necesario, el ambiente del laboratorio debería protegerse de los efectos nocivos de la radiación solar mediante el uso de contraventanas o paneles de vidrio tratados convenientemente. No resulta adecuado el uso de persianas instaladas en el interior ya que pueden dificultar la limpieza y convertirse en una fuente de suciedad.

### 3.5.3 Otros aspectos

Deberían considerarse los siguientes aspectos:

- disponibilidad de agua corriente, o de una calidad adecuada para el uso al que se destina;
- disponibilidad de suministro eléctrico;
- disponibilidad de suministro de gas (canalizado o en bombonas);
- iluminación adecuada en todas las secciones del laboratorio;
- mobiliario y mesas de laboratorio fabricadas de un material liso e impermeable fácil de limpiar y desinfectar;
- mobiliario de laboratorio diseñado para facilitar la limpieza del suelo (por ejemplo mobiliario móvil);
- ausencia en las zonas de análisis de todo tipo de mobiliario, documentos o cualquier otra cosa que no sea estrictamente necesaria para las actividades desarrolladas en el transcurso de los análisis;
- disponibilidad de lugares donde guardar la documentación empleada cuando se manipulan las muestras, los medios de cultivo, los reactivos, etc.;
- disponibilidad de lavamanos en todas las salas de análisis y, en caso necesario, en las áreas generales, preferiblemente cerca de la puerta de entrada;
- disponibilidad de un autoclave para la destrucción del material de desecho y los medios de cultivo contaminados, salvo que en las propias instalaciones se disponga de un sistema de eliminación de los residuos contaminados por incineración;
- sistemas de seguridad que incluyan protección contra el fuego, emergencias eléctricas y ducha de emergencia y lavaojos;
- disponibilidad de servicios de primeros auxilios.

### 3.6 Limpieza y desinfección

Deberían comprobarse los siguientes aspectos.

- a) Los suelos, las paredes, los techos, las superficies de las mesas de laboratorio, el mobiliario y las juntas entre ellos deberían someterse a reparación y mantenimiento periódico para evitar roturas que puedan actuar como fuente de contaminaciones.
- b) Debería realizarse una limpieza y desinfección periódica, para mantener las instalaciones en unas condiciones adecuadas para la realización de los análisis. Las superficies contaminadas o potencialmente contaminadas deberían descontaminarse utilizando desinfectantes con actividad bactericida o fungicida reconocida.

NOTA 1 Si lo permiten las legislaciones nacionales, las salas y el equipamiento pueden descontaminarse por fumigación con vapores de formaldehído.

- c) Los sistemas de ventilación y sus filtros deberían someterse a un mantenimiento periódico y cambiarse los filtros cuando sea necesario.
- d) Debería comprobarse de forma periódica (con una frecuencia que dependerá de los resultados de la última comprobación) la calidad microbiológica de las superficies de trabajo del laboratorio, de las superficies de contacto y del aire.
- e) Puede estimarse la contaminación de las superficies aplicando directamente sobre ellas una placa de contacto que contenga unos adecuados agentes neutralizantes de los antisépticos (por ejemplo lecitina, tiosulfato sódico). La calidad del aire se puede examinar exponiendo durante 15 min una placa de Petri abierta con un medio de agar no selectivo (por ejemplo una placa de agar de recuento – PCA; *plate count agar*) o un agar selectivo adecuado para el microorganismo que se está buscando (por ejemplo para mohos).

NOTA 2 Pueden utilizarse otros métodos para estimar el nivel de contaminación de las superficies y del aire. Véase la Norma ISO 18593.

## 4 PERSONAL

### 4.1 Generalidades

En la Norma ISO/IEC 17025 se pueden consultar los requisitos generales sobre el nivel de competencia del personal.

### 4.2 Competencia

Para cada método o técnica deben definirse criterios objetivos con los que valorar el correcto nivel de competencia, tanto en el momento inicial como a lo largo del tiempo.

El nivel de competencia puede establecerse dentro del propio laboratorio mediante un control de calidad interno (véase el apartado 15.1.2).

NOTA En la Norma ISO 14461-1 se describe una de las formas de investigar los motivos de que el funcionamiento sea deficiente (pipeteo, poca homogeneidad de la suspensión inicial, recuento, etc.) en el caso del recuento de colonias.

### 4.3 Verificación del nivel de competencia del personal a lo largo del tiempo

Debería evaluarse de forma periódica el nivel de competencia del personal a lo largo del tiempo mediante parámetros objetivos, lo que incluye la participación en programas de control de calidad interno, en ejercicios interlaboratorios (véase la Guía ISO/IEC 43-1), el empleo de materiales de referencia o mediante análisis de control de calidad interno del recuento de microorganismos, según se describe en la Norma ISO 14461-2.

### 4.4 Higiene

Deben adoptarse las siguientes precauciones de higiene personal para evitar la contaminación de las muestras y los medios de cultivo y para evitar el riesgo de infección del personal.

- a) Utilizar ropas de laboratorio convenientemente abrochadas, limpias y en buenas condiciones, fabricadas con tejidos que limiten el riesgo de inflamabilidad. Estas ropas no deben utilizarse fuera de las áreas de trabajo y, en la medida de lo posible, de los vestuarios.
- b) Llevar protección para el pelo y la barba, si es necesario para mantener la integridad de la muestra.
- c) Mantener limpias las uñas, y preferiblemente cortas.
- d) Lavarse las manos exhaustivamente en agua templada, preferiblemente en un grifo que no se accione directamente con las manos, antes y después de los análisis microbiológicos e inmediatamente después de utilizar los aseos. Se utilizará jabón líquido o en polvo, si es posible, un antiséptico, y preferiblemente procedente de un dispensador mantenido en buenas condiciones de limpieza. Para el secado de las manos se utiliza papel de un solo uso o toallas de un solo uso. Estas precauciones son aplicables tanto al personal del laboratorio como a los visitantes.
- e) Cuando se esté trabajando con medios, cultivos y muestras expuestas y cuando se esté inoculando, evitar hablar, toser, etc.
- f) Las personas que tengan enfermedades o infecciones de piel deben tomar precauciones cuando los microorganismos procedentes de dichas infecciones puedan contaminar las muestras e invalidar los resultados.
- g) No comer ni beber en el laboratorio, ni introducir comida destinada a consumo personal dentro de los congeladores o las neveras del laboratorio.
- h) Está prohibido pipetear con la boca.

## 5 APARATOS Y EQUIPAMIENTO

### 5.1 Generalidades

Conforme a las buenas prácticas de laboratorio, todos los aparatos y el equipamiento deberían mantenerse limpios y en buenas condiciones de funcionamiento. Antes de su utilización, debería verificarse que el equipamiento es adecuado para el objetivo que se busca y, si se puede comprobar, que funciona correctamente durante su uso.

Cuando sea necesario, el equipamiento y los equipos de medición deberían calibrarse según patrones nacionales trazables, deberían realizarse recalibraciones y todas las comprobaciones intermedias necesarias, y documentarse los procedimientos y resultados.

El equipamiento debería ajustarse y comprobarse periódicamente para asegurar su utilidad y su seguridad. El equipamiento debería controlarse en función de las condiciones de trabajo y de la precisión con la que se soliciten los resultados.

En la mayoría de los casos, la frecuencia de calibración y de las verificaciones de cada equipo no se especifica en esta norma internacional, ya que deben determinarse en cada laboratorio, en función del tipo de equipamiento y del nivel de actividad de cada laboratorio, y conforme a las indicaciones del fabricante. En un número reducido de casos, la frecuencia se ha especificado por haberse considerado esencial.

Los aparatos y el equipamiento deben fabricarse e instalarse pensando en facilitar su manejo y permitiendo que las operaciones de mantenimiento, limpieza, descontaminación y calibración se desarrollen con facilidad.

Todas las incertidumbres en las mediciones indicadas en este capítulo se refieren a los aparatos y al equipamiento y no al método de análisis completo.

Los requisitos sobre la precisión en los equipos de medición se indican a lo largo de todo este capítulo. Se basan en el nivel práctico de tolerancia necesario para demostrar un buen control del equipamiento en su uso rutinario. La precisión indicada se refiere a la incertidumbre metrológica del equipo (véase la Guía 99 de ISO).

Para los equipos con control de temperatura, se comprueba la estabilidad y la homogeneidad de la temperatura antes de empezar a utilizarlos y después de todas las reparaciones o modificaciones que pudieran ejercer un efecto sobre el control de la temperatura.

## 5.2 Cabinas de protección

### 5.2.1 Descripción

Una cabina de protección es una estación de trabajo con flujo de aire horizontal o vertical que elimina del aire el polvo y otras partículas, como los microbios.

El número máximo tolerable de partículas por metro cúbico de un tamaño igual o superior a 0,5  $\mu\text{m}$  determina la categoría de retención de partículas de polvo de la cabina de seguridad. Para las cabinas utilizadas en microbiología de los alimentos, el número de partículas no debería superar las 4 000 por metro cúbico.

Las cabinas utilizadas en los laboratorios de microbiología de los alimentos son de cuatro tipos.

- a) Las cabinas de seguridad de clase I son cabinas protectoras de extracción abiertas por su parte frontal, destinadas a proteger al analista y al medio ambiente pero que no protegen al producto de la contaminación externa. Los aerosoles potencialmente infectados quedan retenidos dentro de la cabina y atrapados por colisión con el filtro. El aire filtrado se descarga normalmente a la atmósfera; en caso contrario, el aire debe atravesar dos filtros HEPA montados en serie. No se recomiendan para el trabajo con patógenos de nivel de seguridad 3 por su dificultad para asegurar y mantener una adecuada protección del analista.
- b) Las cabinas de seguridad de clase II protegen al producto, al analista y al medio ambiente. Recirculan algo de aire filtrado, expulsan algo a la atmósfera e incorporan aire adicional a través de la apertura de trabajo, proporcionando de esta manera protección al analista. Son adecuadas para el trabajo con patógenos de nivel de seguridad 3.
- c) Las cabinas de flujo laminar horizontal protegen al material de trabajo de la contaminación, pero empujan los aerosoles generados hacia la cara del analista. Por consiguiente, no son adecuados para el manejo de cultivos inoculados o la preparación de cultivos de tejidos.
- d) Las cabinas de flujo laminar vertical protegen al producto gracias al empleo de aire de flujo vertical filtrado por filtros HEPA. También protegen al analista mediante el uso de aire recircularizado de forma interna. Son especialmente adecuadas para proporcionar un ambiente aséptico donde manejar productos estériles y para proteger al analista cuando manipule productos pulverizados.

Se utilizan cabinas de protección para todo el trabajo relacionado con el manejo de patógenos y de material en polvo contaminado, si así lo definen las legislaciones nacionales.

No se recomienda utilizar un mechero de gas o un incinerador de asas dentro de las cabinas de protección. Si llegara a ser necesario, el mechero de gas debería tener una llama pequeña para que no distorsione al flujo de aire. Una alternativa adecuada es el empleo de materiales desechables (asas de siembra, pipetas, etc.).

### 5.2.2 Uso

Las cabinas deberían mantenerse lo más despejadas de equipos posible.

En la medida de lo posible, se introduce todo lo que se vaya a necesitar dentro de la cabina antes de comenzar el trabajo, para minimizar el número de movimientos de los brazos hacia dentro y hacia fuera de la apertura de trabajo. El equipamiento y los materiales se sitúan de forma que se minimice la distorsión del flujo de aire en la apertura de trabajo.

Los analistas deberían estar bien entrenados en el uso correcto de las cabinas, para garantizar su seguridad y la integridad del producto o del cultivo.



### 5.2.3 Limpieza y desinfección

El área de trabajo se limpia y desinfecta después de cada uso utilizando un desinfectante no corrosivo adecuado, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se examinan periódicamente las rejillas metálicas que protegen los pre-filtros y se limpian con un paño humedecido con desinfectante.

En las cabinas de flujo laminar, la superficie del filtro debería limpiarse a vacío periódicamente, con cuidado de no dañar el interior del filtro.

Las cabinas de seguridad deberían fumigarse antes de cambiar los filtros o realizar su mantenimiento.

Después de limpiar las cabinas, pueden utilizarse lámparas UV para su desinfección. Las lámparas UV deberían limpiarse periódicamente y reemplazarse siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 5.2.4 Mantenimiento e inspección

Se utilizan cabinas de protección adecuadas a los objetivos y a las condiciones ambientales del laboratorio.

Una persona cualificada debe comprobar la eficacia de cada cabina de protección al instalarla, y, posteriormente, a intervalos regulares, según las recomendaciones del fabricante, así como después de cada reparación o modificación.

La verificación periódica de la ausencia de todo tipo de contaminación microbiana debería realizarse mediante una comprobación de la superficie de trabajo y de las paredes de la cabina.

Debería realizarse una verificación periódica del número de microorganismos presentes en el aire mientras funcionan los filtros, utilizando un equipamiento normal. Por ejemplo, se exponen durante 30 min dentro de cada cabina varias placas de Petri abiertas con medio de cultivo de agar no selectivo (por ejemplo PCA). Pueden utilizarse otros métodos.

## 5.3 Balanzas y diluidores gravimétricos

### 5.3.1 Utilización y medida de la incertidumbre

Las balanzas se utilizan fundamentalmente para pesar la porción para análisis de la muestra que se va a analizar y los reactivos y componentes de los medios de cultivo. Además, se pueden utilizar para realizar medidas de dilución de volúmenes líquidos por masa.

Los diluidores gravimétricos son instrumentos electrónicos que consisten en una balanza y en un dispensador de líquidos programable, que se utilizan durante la preparación de las suspensiones iniciales de la muestra; funcionan mediante la adición de un diluyente a una submuestra en una determinada proporción. La submuestra se pesa, con el margen de tolerancia descrito en la aplicación, y el diluidor dispensa el volumen de diluyente necesario de acuerdo con la proporción requerida (por ejemplo 9 a 1 para las diluciones decimales).

Los laboratorios de microbiología de los alimentos deben estar equipados con balanzas adecuadas para el intervalo de medición y de la incertidumbre tolerada para los distintos productos que se deben pesar.

Salvo indicación en sentido contrario, los errores máximos permisibles cuando se pesan muestras deberían ser del 1%, o inferiores a este valor.

Este equipamiento se coloca sobre una superficie horizontal estable, fijada al suelo en caso necesario para asegurar su nivelación y protegida de las vibraciones y de las corrientes de aire.

### 5.3.2 Limpieza y desinfección

Este equipamiento debería limpiarse y desinfectarse después de cada uso o si se han producido derrames, con un desinfectante adecuado y no corrosivo.

### 5.3.3 Calibración y verificación del funcionamiento

Debe verificarse periódicamente el correcto funcionamiento de la balanza, durante su uso y después de la limpieza, mediante pesadas de comprobación realizadas por una persona experta. Debe comprobarse la calibración a lo largo del intervalo completo por parte de una persona cualificada, con una periodicidad que dependerá del grado de utilización.

Las pesadas de comprobación también pueden realizarse inmediatamente después de la calibración de la balanza.

## 5.4 Homogeneizadores, trituradoras y mezcladoras

### 5.4.1 Descripción

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

Pueden utilizarse los siguientes aparatos:

- un mezclador peristáltico (“stomacher”) con bolsas estériles, preferiblemente junto con un sistema de control de la velocidad y el tiempo; o
- un homogeneizador giratorio (trituradora), con una velocidad teórica de entre 8 000 r/min y 45 000 r/min, ambas inclusive, con vasos metálicos o de cristal esterilizables, con tapa; o
- un mezclador de vibración (pulsificador), con bolsas estériles; o
- cualquier otro sistema de homogeneización de eficacia equivalente.

En algunos casos, se puede realizar una mezcla manual utilizando cuentas de vidrio estériles de un diámetro apropiado (aproximadamente de 6 mm; véanse las Normas ISO 6887-2 a ISO 6887-4 e ISO 8261).

### 5.4.2 Utilización

El tiempo típico de operación de un homogeneizador peristáltico es de entre 1 min y 3 min (véanse las Normas ISO 6887-2 a ISO 6887-4 e ISO 8261 para alimentos específicos).

No utilizar este tipo de aparato con algunos productos alimenticios, tales como:

- productos que puedan rasgar la bolsa (por la presencia de partículas afiladas, duras o secas);
- productos difíciles de homogeneizar debido a su textura (por ejemplo embutidos de tipo salami).

El homogeneizador giratorio debe estar funcionando durante el tiempo necesario para que el número total de revoluciones sea de entre 15 000 r/min y 20 000 r/min. Incluso con los homogeneizadores de menor velocidad, este tiempo no debe ser mayor de 2,5 min.

El mezclador de vibración puede utilizarse con la mayoría de los productos alimenticios, incluyendo los productos duros o secos. El tiempo típico de funcionamiento es de entre 0,5 min y 1 min. Si es probable que los microorganismos se encuentren en el interior, por debajo de estructuras cohesivas, la muestra debería cortarse en trozos pequeños antes de procesarse.

Las cuentas de vidrio pueden utilizarse para la preparación mediante agitación de las suspensiones iniciales de algunos productos viscosos o densos, en especial de algunos productos lácteos (consúltense las normas específicas).

### 5.4.3 Limpieza y desinfección

Los mezcladores de vibración y los homogeneizadores peristálticos se limpian y desinfectan de forma periódica, y siempre que se haya producido un derrame o una fuga de una bolsa.

En el caso de los homogeneizadores giratorios, los vasos de metal o de vidrio se limpian y se esterilizan después de cada uso.

#### 5.4.4 Mantenimiento

La inspección y el mantenimiento de este equipamiento se realizan siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 5.5 pH-metro

#### 5.5.1 Descripción

Se utiliza un pH-metro para medir la diferencia de potencial a una temperatura determinada, entre un electrodo de medida y un electrodo de referencia, ambos introducidos dentro del producto. Debe ser capaz de medir el pH con una precisión de  $\pm 0,05$  unidades de pH y su resolución debe ser de 0,01 unidades de pH. El pH-metro debe estar equipado con un sistema de compensación de la temperatura manual o automático.

NOTA El electrodo de medida y el electrodo de referencia suelen estar juntos dentro de un sistema de electrodos combinados.

#### 5.5.2 Uso

Se utiliza un pH-metro para medir el valor del pH de los reactivos y medios de cultivo, para comprobar si se necesita algún ajuste durante su preparación y como control de calidad tras la esterilización.

También se puede utilizar para medir el valor del pH de las muestras y de las suspensiones de las muestras. El uso de un pH-metro se discute en la norma específica de cada producto que se va a analizar, en la que se especifican las condiciones para la determinación del valor del pH y del ajuste del pH.

El pH-metro se ajusta siguiendo el manual de instrucciones proporcionado por el fabricante para medir el valor del pH a una temperatura normalizada, por ejemplo de 25 °C. El valor del pH se mide una vez alcanzada la estabilización. El valor se registra con dos cifras decimales.

NOTA La lectura se puede considerar estable cuando el valor del pH medido a lo largo de un período de más de 5 s no oscila en más de 0,02 unidades. Si los electrodos están en buenas condiciones, el equilibrio se alcanza normalmente en 30 s.

#### 5.5.3 Verificación y ajuste

El funcionamiento del pH-metro se verifica siguiendo las indicaciones del fabricante, utilizando un mínimo de dos, y preferiblemente tres, disoluciones tamponadas patrón, al menos de forma diaria, antes de utilizarse. Se definen los errores máximos permisibles para esta verificación, en función de su uso.

Las disoluciones patrón deben poseer valores de pH definidos con dos cifras decimales a la temperatura de medida (por lo general, pH 7,00 y pH 4,00 y/o pH 9,00 a 25 °C, siguiendo las indicaciones del fabricante). Los patrones utilizados deben abarcar el valor de pH que se quiere medir.

Tras la verificación del pH-metro con las dos disoluciones tamponadas patrón trazables, el pH debería ajustarse utilizando una tercera disolución tamponada, y concretamente una disolución tamponada control, por ejemplo de pH 5 o pH 8.

El pH-metro se ajusta cuando las verificaciones proporcionan resultados que caen fuera de los errores máximos permisibles, y siguiendo las indicaciones del fabricante.

Este ajuste debería ir seguido de una calibración, que permitiría estimar la incertidumbre de la medida del pH-metro.

#### 5.5.4 Mantenimiento

La comprobación y el mantenimiento de los electrodos se realizan siguiendo las indicaciones del fabricante. En concreto, es necesario revisar de forma periódica

- las condiciones en las que se encuentran los electrodos en cuanto a envejecimiento y suciedad, y
- el tiempo de respuesta y la estabilidad.

Los electrodos se enjuagan con agua destilada o desionizada después de cada uso. Tomando en consideración los procesos de envejecimiento y acumulación de suciedad en los electrodos, se limpian más exhaustivamente de forma periódica, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los electrodos se almacenan siguiendo las indicaciones del fabricante.

## **5.6 Autoclave**

### **5.6.1 Descripción**

Un autoclave permite alcanzar una temperatura de saturación de vapor en la cámara, y se utiliza para la destrucción de los microorganismos.

El autoclave debería estar equipado con

- como mínimo una válvula de seguridad,
- una llave de paso de drenaje,
- un dispositivo de regulación que permita que la temperatura de la cámara se mantenga dentro de un intervalo de  $\pm 3$  °C de la temperatura programada (para tener en cuenta la incertidumbre de la medida asociada al termopar), y
- una sonda de temperatura o un termopar de registro.

También debería incluir un temporizador y un registrador de temperaturas.

### **5.6.2 Uso**

Para la esterilización a vapor, se expulsa todo el aire antes de que empiece a subir la presión. Si el autoclave no dispone de un sistema automático de evacuación, es necesario eliminar el aire hasta que se libere un chorro de vapor continuo.

El vapor saturado de la cámara debe estar como mínimo a una temperatura de 121 °C para poder destruir los microorganismos.

No se utiliza el autoclave para la esterilización de equipamiento limpio (y/o medios de cultivo) a la vez que para la descontaminación de equipamiento utilizado (y/o medio de cultivos utilizados) durante el mismo ciclo de esterilización.

Es preferible utilizar autoclaves distintos para estos dos procesos. Después de haberse autoclavado, debería dejarse enfriar todo el material y el equipamiento dentro del autoclave antes de retirarlo.

Por cuestiones de seguridad, no se retira el material hasta que la temperatura haya descendido por debajo de 80 °C aproximadamente.

### **5.6.3 Mantenimiento**

Se limpian periódicamente la cámara, los filtros de drenaje y el sellado de la puerta. Se comprueba la integridad del sistema de sellado de la puerta. En caso necesario se realizan de forma periódica los procesos de drenaje y desincrustación. Se siguen las indicaciones del fabricante.

### **5.6.4 Verificación y calibración**

El autoclave debe mantenerse en buenas condiciones de funcionamiento y debe inspeccionarse periódicamente por personal cualificado competente siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los instrumentos de control se mantienen en unas correctas condiciones de trabajo y se comprueban periódicamente.

La validación inicial debería incluir estudios de funcionamiento para cada ciclo de operaciones y para cada configuración de carga utilizada en la práctica. Este proceso debería repetirse después de cada modificación o reparación importantes. Debería colocarse un número suficiente de sensores dentro de la carga para demostrar que la penetración del calor es adecuada en todos los lugares. La validación y la re-validación deberían considerar si los tiempos de calentamiento y enfriamiento son adecuados, además de la temperatura de esterilización.

Cuando no se disponga de un registro trazable de la eficiencia del proceso, debería incluirse como mínimo un indicador del proceso en el centro de la carga, para verificar el proceso de calentamiento.

## **5.7 Preparador de medios**

### **5.7.1 Descripción**

Un preparador de medios está diseñado fundamentalmente para la esterilización de grandes volúmenes de medios (> 1 l). Consiste en un recipiente de calentamiento, una camisa de agua y un sistema de agitación constante. Este tipo de equipamiento debe incluir también un indicador de temperaturas, un indicador de presión, un temporizador y una válvula de seguridad.

Además, la unidad debería incluir un cierre de seguridad para evitar que se abra hasta que se haya alcanzado una temperatura < 80 °C.

### **5.7.2 Uso**

Se siguen en todo momento las indicaciones del fabricante.

Todo el proceso completo de producción tiene lugar dentro del aparato. Tras la adición de todos los ingredientes, se disuelven por agitación y calentamiento. A continuación se realiza la esterilización

### **5.7.3 Mantenimiento**

El preparador se lava y se enjuaga exhaustivamente con agua pura entre cada lote de medios.

### **5.7.4 Verificación**

El preparador de medios debe mantenerse en buenas condiciones de funcionamiento y debe inspeccionarse periódicamente por personal cualificado competente siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los instrumentos de monitorización se mantienen en unas correctas condiciones de trabajo y se comprueba periódicamente su funcionamiento.

La validación inicial debería incluir estudios de funcionamiento para cada ciclo de operaciones y para cada cantidad de carga utilizada en la práctica. Este proceso debería repetirse después de cada modificación o reparación importantes. Pueden utilizarse dos sondas de temperatura, una adyacente a la sonda control, y otra alejada de ella, para demostrar si el calentamiento es uniforme.

Debería comprobarse la temperatura y duración de cada ciclo.

## **5.8 Incubador**

### **5.8.1 Descripción**

Un incubador consiste en una cámara aislada que permite que la temperatura se mantenga estable y se distribuya de forma uniforme dentro del máximo error permisible de temperaturas establecido en el método de análisis.

### **5.8.2 Uso**

Los incubadores deben estar equipados con un sistema de regulación que permita que la temperatura u otros parámetros se mantengan homogéneos y estables en todo el volumen de trabajo. Se define el volumen de trabajo para asegurar que se consigue este objetivo.

Si la temperatura ambiente es cercana o superior a la del incubador, es necesario incorporar un sistema de refrigeración a la cámara.

Las paredes de los incubadores deberían protegerse de la luz solar directa.

En la medida de lo posible, los incubadores no deberían llenarse completamente en una sola operación, ya que los medios de cultivo tardarán mucho tiempo en alcanzar el equilibrio de temperaturas, independientemente del tipo de incubador (de convección de aire o de otro tipo). Las puertas del incubador no se mantienen abiertas durante períodos de tiempo prolongados.

Se debería prestar atención a la circulación del aire cuando se introduce la carga en los incubadores (véase el apartado 10.2.4).

### **5.8.3 Limpieza e higienización**

Se limpian e higienizan de forma periódica las paredes interiores y exteriores del incubador y, en caso necesario, se elimina el polvo presente en el sistema de ventilación.

### **5.8.4 Verificación**

Se comprueba la estabilidad de la temperatura y la homogeneidad de la distribución de temperaturas a la(s) temperatura(s) de trabajo a lo largo del volumen útil del incubador, mediante el uso simultáneo de varios termómetros o de varios termopares de intervalo de temperaturas y precisión conocidas y adecuadas.

Esta información se utiliza para definir el intervalo de trabajo aceptable del incubador y la posición óptima del termómetro utilizado para monitorizar las temperaturas de trabajo.

Por ejemplo, para conseguir una temperatura de  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , cuando el perfil de datos muestra un intervalo de entre  $36,8\text{ °C}$  a  $37,3\text{ °C}$  a lo largo del incubador, el intervalo de trabajo debería reducirse hasta de  $36,2\text{ °C}$  a  $37,7\text{ °C}$ , para asegurar que todas las partes del incubador alcanzan la temperatura prevista de  $37\text{ °C}$ .

Este proceso debería repetirse después de cada modificación o reparación importantes.

La temperatura de funcionamiento debería comprobarse utilizando uno o más termómetros de mínimas y máximas o con termopares de registro, por ejemplo.

El termómetro o el termopar de registro utilizado para el control de rutina del incubador deben fijarse en una posición determinada cuya temperatura sea la ideal, según el perfil de datos.

La temperatura del incubador se comprueba como mínimo todos los días de trabajo. Con este objetivo, todos los incubadores deben incorporar como mínimo un sistema de medida de su funcionamiento, cuya sonda puede estar sumergida en glicerol (u otro acumulador de calor adecuado), dentro de un recipiente sellado.

Pueden utilizarse otros sistemas de comprobación de características equivalentes.

## **5.9 Neveras, cámaras de refrigeración**

### **5.9.1 Descripción**

Son cámaras que permiten el almacenamiento en condiciones de refrigeración. Para la conservación de muestras procedentes de alimentos destinadas al análisis, la temperatura debe ser de  $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  (máximos errores permisibles), salvo en aplicaciones especiales. En el resto de los casos, la temperatura será de  $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ , salvo indicación en sentido contrario.

### **5.9.2 Uso**

Para evitar que se produzca contaminación cruzada, se utilizan cámaras diferentes, o al menos, contenedores diferentes con los que asegurar una separación física, para el almacenamiento de:

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

Las neveras, los refrigeradores y las salas frías de almacén se ocupan manteniendo una adecuada circulación del aire e intentando minimizar las potenciales contaminaciones cruzadas.

### **5.9.3 Verificación**

Se comprueba la temperatura de cada cámara todos los días de trabajo utilizando un termómetro o una sonda instalada de forma permanente. La precisión del sistema de monitorización de temperaturas depende del uso al que se destine la unidad.

### **5.9.4 Mantenimiento y limpieza**

Para asegurar un correcto funcionamiento, se realizan las siguientes operaciones de mantenimiento de forma periódica:

- eliminación del polvo de las aspas del motor o de las placas externas de intercambio de calor;
- descongelación;
- limpieza e higienización del interior de las cámaras.

## **5.10 Congeladores y ultracongeladores**

### **5.10.1 Descripción**

Un congelador es una cámara que garantiza el almacenamiento en condiciones de congelación. Salvo indicación en sentido contrario, la temperatura debe ser inferior a  $-15\text{ °C}$ , y preferiblemente inferior a  $-18\text{ °C}$  para las muestras procedentes de alimentos.

Un ultracongelador es una cámara que garantiza el almacenamiento en condiciones de ultracongelación. Salvo indicación en sentido contrario, la temperatura debe ser inferior a  $-70\text{ °C}$ .

### **5.10.2 Uso**

#### **5.10.2.1 Congelador**

Deben disponer de cámaras diferentes, o al menos, de contenedores diferentes con los que asegurar una separación física para el almacenamiento de:

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

El congelador se carga de forma que se mantenga una temperatura suficientemente baja, especialmente cuando se introducen productos no congelados.

#### **5.10.2.2 Ultracongelador**

Su utilidad principal es almacenar microorganismos, cultivos de trabajo y/o de referencia, y reactivos.

El congelador se carga de forma que se mantenga una temperatura suficientemente baja, previniendo la contaminación cruzada entre microorganismos y reactivos.

### **5.10.3 Verificación**

Se comprueba periódicamente la temperatura de cada cámara utilizando un sistema de monitorización de temperaturas adecuado.

#### 5.10.4 Mantenimiento

Se realizan periódicamente las siguientes operaciones de mantenimiento:

- eliminación del polvo de las aspas del motor o de las placas externas de intercambio de calor (si son accesibles);
- descongelación;
- limpieza e higienización del interior de las cámaras.

### 5.11 Baño termostático

#### 5.11.1 Descripción

Para mantener una temperatura determinada se necesita un baño termostático, lleno de un líquido (agua, etilén glicol, etc.), con o sin una tapa ajustada o algún otro sistema que limite la evaporación. El control de temperaturas suele ser de mayor precisión que el de los incubadores de aire, lográndose unos errores permisibles máximos de  $\pm 0,5$  °C o aún mejores. Las temperaturas de trabajo y los errores máximos permisibles vienen estipulados en cada método o aplicación individual. Es necesario incorporar un sistema de refrigeración para mantener una temperatura similar o inferior a 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 del agar fundido estéril durante la preparación de los medios;
- calentamiento del agar fundido estéril a una temperatura definida para su uso en determinados métodos;
- preparación de las suspensiones iniciales de las muestras o soluciones a una temperatura controlada;
- tratamiento por calentamiento de las suspensiones iniciales de las muestras a una temperatura controlada (por ejemplo durante la pasteurización).

Cuando se necesite un control preciso de la temperatura, el baño debe incluir una bomba de agua circulante y un sistema automático de regulación de la temperatura. La agitación del líquido no debe causar dispersión de gotas.

Para un uso de precisión a altas temperaturas son preferibles los baños con tapa. Deberían utilizarse baños con tapas inclinadas que permiten que escurra el líquido condensado.

Para la incubación de los medios inoculados, se mantiene el nivel de líquido de forma que la parte superior del medio de análisis quede por lo menos 2 cm por debajo del nivel de líquido del baño durante toda la incubación.

Deberían introducirse otros recipientes dentro de los baños de forma que sus contenidos queden por debajo del nivel del líquido del baño.

La profundidad de inmersión debe impedir que entre agua a través de su apertura.

Pueden necesitarse sistemas que aseguren la estabilidad de los recipientes, como por ejemplo gradillas.

Todos los recipientes deberían secarse al ser retirados de los baños y antes de su uso posterior.

#### 5.11.3 Verificación

Se comprueba la estabilidad y la homogeneidad de la temperatura a lo largo de todo el baño, antes de empezar a utilizarlo y después de cada reparación o modificación que afecte al control de temperaturas.



Todos los baños se monitorizan con un termómetro, un termopar o un sistema de registro de temperaturas de la mínima incertidumbre de medida posible (véase el apartado 5.28.2), e independiente del sistema automático de regulación de temperaturas.

Puede utilizarse una pantalla digital, siempre que se haya verificado su precisión y su resolución.

La temperatura del baño se monitoriza durante cada uso y como mínimo de forma diaria en el caso de tiempos de incubación prolongada.

#### **5.11.4 Mantenimiento**

El nivel de llenado de los baños debería ser el aconsejado por el fabricante. Preferiblemente, debería utilizarse agua destilada o desionizada para la incubación de los cultivos.

Se comprueba periódicamente el nivel del líquido del baño para asegurar su correcto funcionamiento y que la inmersión de todos los objetos es satisfactoria. El nivel de líquido debe cubrir todos los elementos calefactores.

Los baños deberían vaciarse, limpiarse, higienizarse y volverse a llenar de forma periódica, con una frecuencia que dependerá del uso al que esté sometido, o después de que se haya producido un vertido.

### **5.12 Vaporizadores, incluidos los baños de agua en ebullición**

#### **5.12.1 Descripción**

Los vaporizadores y los baños de agua en ebullición consisten en un elemento calefactor rodeado de agua, situado dentro de un recipiente cerrado con una tapa bien ajustada. En un vaporizador, se crea vapor a presión atmosférica; en un baño de agua en ebullición, se calienta agua a una temperatura igual o próxima al punto de ebullición, con o sin producción de vapor.

#### **5.12.2 Uso**

Los principales usos son los siguientes:

- fusión de los medios de agar;
- preparación de medios sensibles al calor;
- reducción de la contaminación del pequeño equipamiento entre usos.

El tanque debe contener un nivel de agua de seguridad adecuado, para asegurar que los elementos calefactores están siempre bien recubiertos.

También puede utilizarse un autoclave con capacidad de liberación de vapor.

#### **5.12.3 Mantenimiento**

Los vaporizadores y los baños de agua en ebullición se deben mantener limpios.

En caso necesario, debería realizarse periódicamente un tratamiento con un agente desincrustante, con una frecuencia que dependerá de la dureza local del agua.

### **5.13 Horno de esterilización**

#### **5.13.1 Descripción**

Un horno de esterilización es una cámara capaz de mantener una temperatura de entre 160 °C y 180 °C para la destrucción de los microorganismos mediante calor seco.

### 5.13.2 Uso

Solamente el material más resistente como el material metálico y de vidrio debe esterilizarse en el horno de esterilización; no utilizar para los objetos de plástico y de goma.

Todo el material metálico y de vidrio que se va a esterilizar en el horno se lava antes de su esterilización.

Si se esteriliza en el horno de esterilización material de vidrio aforado, se verifica periódicamente la precisión de los volúmenes marcados.

La temperatura debe ser uniforme a lo largo de toda la cámara. El horno debe incluir un termostato y un termómetro o un sistema de registro de las temperaturas de precisión adecuada.

Debe incluir un indicador de duración, un programador o un temporizador.

Una vez alcanzada la temperatura de trabajo, el proceso de esterilización debe durar como mínimo 1 h a 170 °C o una combinación equivalente de temperatura/tiempo.

Tras la esterilización, y para evitar roturas, se debería dejar enfriar el material de vidrio dentro del horno antes de ser retirado.

### 5.13.3 Verificación

Se comprueba la estabilidad y la homogeneidad de la temperatura a lo largo de todo el horno, antes de iniciar su uso y después de cada reparación o modificación que pudiera afectar al control de la temperatura.

El horno debe incluir un sistema de registro de temperaturas, un termopar o un termómetro calibrado con la precisión adecuada, independientes del sistema automático de regulación de la temperatura. El sistema de monitorización debe presentar una resolución de 1 °C, o aún mejor, para la temperatura del horno utilizada.

La temperatura del horno debería monitorizarse y registrarse a lo largo de todo su uso.

### 5.13.4 Mantenimiento

Se limpian las superficies internas cuando sea necesario.

## 5.14 Horno microondas

### 5.14.1 Descripción

Un horno microondas es un aparato que permite calentar objetos mediante energía de microondas a presión atmosférica.

### 5.14.2 Uso

Los equipos disponibles en la actualidad solamente permiten calentar líquidos o fundir medios de cultivo con agar.

**ADVERTENCIA – No se calientan en el microondas medios que contengan componentes termosensibles hasta que se haya comprobado que esta forma de calentamiento no afecta el funcionamiento del medio. Aún no se ha determinado la eficiencia de las microondas sobre la esterilización de los medios de cultivo, por lo que no se deben utilizar los hornos microondas con este objetivo.**

El horno debe ser capaz de calentar líquidos y medios de cultivo de forma controlada mediante el ciclo de emisión de microondas. La distribución de las microondas debe ser homogénea para evitar áreas de sobrecalentamiento. Los hornos con plato giratorio o con agitador proporcionan una mejor distribución del calor.

No se utiliza equipamiento de metal, incluidos los tapones metálicos. Los tapones o las tapas de las botellas se aflojan antes de calentarse.

El calentamiento durante períodos más largos a potencias inferiores puede ofrecer una mejor distribución del calor.

**ADVERTENCIA – Una vez calentados, los objetos se manejan con precaución. Su contenido puede estar sobrecalentado y verterse al entrar en ebullición y las botellas pueden explotar.**

Cuando se funde medio de agar, se recomienda utilizar una programación de baja potencia (por ejemplo en el ciclo de descongelación) y un baño caliente de agua (por ejemplo un vaso de precipitados apto para microondas con 50 ml a 100 ml de agua), para favorecer el proceso de calentamiento.

Tras el proceso de calentamiento, se recomienda un tiempo de reposo de cómo mínimo 5 min antes de retirar el material del horno microondas.

#### **5.14.3 Verificación**

Deben establecerse las condiciones de potencia y tiempo de calentamiento en estudios iniciales, para los distintos volúmenes de líquidos y de medios de cultivo que se emplean de forma rutinaria, para asegurar un funcionamiento óptimo y para evitar el sobrecalentamiento de los productos sensibles.

#### **5.14.4 Mantenimiento**

El horno se limpia inmediatamente después de que se haya producido cualquier tipo de vertido, así como de forma periódica, con una frecuencia que depende del grado de utilización.

Deberían inspeccionarse periódicamente la integridad del sellado de las puertas del horno, así como las posibles fugas de radiación procedentes del horno.

### **5.15 Lavavajillas para material de vidrio**

#### **5.15.1 Descripción**

Los lavavajillas para material de vidrio son máquinas controladas electrónicamente destinadas al lavado general del material de vidrio del laboratorio, y que pueden programarse para realizar diferentes ciclos de lavado y aclarado (por ejemplo con ácido o con agua destilada o desionizada).

Los sistemas para el lavado de pipetas de vidrio son lavavajillas para material de vidrio especiales, diseñados para limpiar el estrecho canal interior de las pipetas.

#### **5.15.2 Uso**

Existen muchos tipos de lavavajillas para material de vidrio disponibles, que en general se instalan y utilizan siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### **5.15.3 Verificación**

Se comprueba la efectividad del lavado mediante inspección visual y, en aplicaciones críticas, se realizan análisis para asegurar que el material de vidrio carece de sustancias inhibidoras.

Puede comprobarse la generación de residuos ácidos o básicos utilizando una disolución indicadora de pH; debería obtenerse un pH dentro del intervalo de entre 6,5 unidades y 7,3 unidades.

#### **5.15.4 Mantenimiento**

Se programa un mantenimiento periódico siguiendo las indicaciones del fabricante, cumpliendo con una frecuencia adecuada.

Pueden necesitarse revisiones más frecuentes en los equipos utilizados asiduamente o en localidades de aguas más duras.

## 5.16 Microscopios ópticos

### 5.16.1 Descripción

Existen distintos tipos de microscopios: monoculares, binoculares, con VDU, con cámara o equipo de fluorescencia, etc. y con fuente de luz interna o externa. En los análisis bacteriológicos, se utilizan objetivos con una capacidad de aumento desde  $\times 10$  (lentes secas) hasta aproximadamente  $\times 100$  (inmersión en aceite, incorporando un sistema de amortiguación a las torretas), obteniéndose un aumento global de entre  $\times 100$  y  $\times 1\,000$ . La microscopía de contraste de fase es también una herramienta inestimable para el análisis de preparaciones “en húmedo”.

### 5.16.2 Uso

La óptica del microscopio se dispone siguiendo las indicaciones del fabricante. El eje óptico de la luz procedente de la bombilla de alta intensidad debe atravesar el centro del condensador, el portaobjetos, el objetivo y el ocular, de forma que se eviten las aberraciones cromáticas o esféricas.

### 5.16.3 Mantenimiento

Se siguen las indicaciones del fabricante en lo referente a almacenamiento, limpieza y revisiones. Se previene la condensación que se produce cuando el grado de humedad es alto, ya que puede ocasionar deterioro y pérdida de calidad de las lentes.

Diariamente, o después de cada uso, se limpia el aceite de las lentes de inmersión y de las partes con las que entra en contacto, utilizando unas toallita para lentes. Se utiliza el disolvente recomendado por el fabricante. Se retira periódicamente la grasa que se acumula en los oculares procedente de las pestañas.

Los sistemas ópticos se pueden dañar con facilidad, por lo que es deseable mantener un programa de revisiones, preferiblemente por parte del fabricante.

## 5.17 Mecheros de gas o incineradores de agujas

### 5.17.1 Descripción

Los mecheros de gas (Bunsen) producen una llama estrecha descubierta utilizando gas procedente de una bombona o de un suministro central. Modulando la cantidad de aire que se mezcla con el gas se controla la cantidad de calor producida.

Los incineradores de asas utilizan gas o electricidad para conseguir calor rojo sin llama utilizado para esterilizar las asas de siembra y las agujas utilizadas para manipular los cultivos.

### 5.17.2 Uso

Los mecheros de gas se utilizan fundamentalmente para esterilizar las agujas y las asas de siembra metálicas calentándolas al rojo, y para esterilizar a la llama otros pequeños equipamientos no desechables.

Los incineradores de asas se utilizan para esterilizar las agujas y las asas de siembra metálicas y son el sistema de elección cuando se manipulan bacterias patogénicas, ya que se evitan las salpicaduras y se reducen los riesgos de contaminación cruzada.

Los mecheros de gas pueden producir mucho calor y turbulencias de aire en el laboratorio.

Puede conseguirse trabajar en condiciones asépticas sin necesidad de mecheros de gas, mediante el uso de materiales desechables.

Debería evitarse el uso de mecheros de gas en las cabinas de protección, debido a que interfieren de forma inaceptable con el flujo de aire laminar. En este caso, se recomienda utilizar equipamiento estéril desechable.

### 5.17.3 Mantenimiento

Se limpian y desinfectan periódicamente los mecheros y las cubiertas de los incineradores de agujas, especialmente si se ha derramado un cultivo bacteriano sobre los equipos.

## 5.18 Dispensadores de reactivos y medios de cultivo

### 5.18.1 Descripción

Los dispensadores son instrumentos o sistemas utilizados para distribuir los reactivos y los medios de cultivo en los tubos, botellas o placas de Petri. Dichos sistemas incluyen desde las simples probetas, pipetas o jeringuillas manuales pasando por las jeringas automáticas y las bombas peristálticas, hasta los sistemas programables electrónicos con dispositivos de reparto automático variable.

### 5.18.2 Uso

Los equipos limpios utilizados para dispensar los reactivos y los medios de cultivo deben carecer de sustancias inhibitoras. Se utilizan tubos capilares diferentes para los medios selectivos, para minimizar los efectos de la lixiviación/transporte pasivo de dichas sustancias.

Si se necesita que la distribución de los reactivos y los medios de cultivo estériles se realice en condiciones asépticas, todas las partes del equipo de distribución que entren en contacto con el producto deben estar en condiciones estériles.

### 5.18.3 Verificación

La incertidumbre de la medida del instrumento o del aparato debe ser la adecuada en función del error máximo permisible de volumen dispensado, que, de forma rutinaria, no debe ser superior a  $\pm 5\%$ . El error máximo permisible en la medida del volumen de líquido utilizado para preparar diluciones decimales es de  $\pm 2\%$ .

Se comprueban los volúmenes dispensados antes de comenzar a utilizarlo, a continuación de forma periódica siguiendo un programa documentado, y siempre después de haber efectuado cualquier tipo de ajuste que afecte al volumen dispensado.

### 5.18.4 Limpieza y mantenimiento

Se limpia la superficie externa del dispensador después de cada uso. Se lavan y enjuagan abundantemente todas las partes del dispensador que entran en contacto con el producto y se esterilizan cuando se tengan que utilizar para dispensar líquidos estériles. No se utilizan desinfectantes sobre las superficies que entran en contacto con el producto que se dispensa, ya que pueden transmitir propiedades inhibitoras.

Todos los dispensadores automáticos deben mantenerse en buenas condiciones mediante revisiones periódicas realizadas según las indicaciones del fabricante.

## 5.19 Mezclador tipo vórtex

### 5.19.1 Descripción

Este instrumento facilita la mezcla homogénea de los medios líquidos (por ejemplo las diluciones decimales y la muestras líquidas que se van a analizar), o las suspensiones de las células bacterianas en un medio líquido.

La mezcla se consigue mediante un movimiento rotacional excéntrico del contenido del tubo o del recipiente (produciendo un vórtex).

### 5.19.2 Uso

Se presiona la base del tubo o del recipiente que contiene el líquido que se debe mezclar contra la cabeza del mezclador. La velocidad de mezcla se controla regulando la velocidad del motor o el ángulo de contacto con la cabeza del mezclador.

El analista debería asegurar que no se producen derrames durante la mezcla, ajustando la velocidad necesaria y sujetando el tubo a una distancia respecto a su extremo superior de aproximadamente un tercio de su longitud, para poder controlar mejor el tubo y evitar que el contenido del tubo ascienda excesivamente por su interior.

Deberían tomarse las precauciones necesarias para minimizar la emisión de aerosoles cuando se abren los recipientes después de haberse sometido a agitación en el vórtex.

### **5.19.3 Verificación**

La evidencia de que se está mezclando correctamente consiste en la aparición de un vórtex hasta el fondo del líquido durante la operación de mezcla.

### **5.19.4 Mantenimiento**

Se mantiene limpio este equipamiento. Si se llega a producir algún derrame, el equipo se descontamina utilizando un desinfectante de laboratorio adecuado.

## **5.20 Contador de colonias**

### **5.20.1 Descripción**

Los contadores de colonias manuales utilizan un sistema de recuento activado por presión y suelen ofrecer una señal audible cada vez que se realiza un contaje y una lectura digital del recuento total. Pueden ser simples punteros o consistir en una bandeja iluminada con una cuadrícula calibrada para la placa y una lupa de aumento para ayudar a la detección de las colonias. Los contadores de colonias automáticos electrónicos, que incorporan analizadores de imagen, funcionan mediante una combinación de *hardware* y *software* incorporando el uso de una cámara y un monitor.

### **5.20.2 Uso**

Se siguen las instrucciones del fabricante. Se ajusta la sensibilidad del contador automático para asegurar que se identifican todas las colonias buscadas. Los contadores de colonias automáticos electrónicos también necesitan una programación aparte cuando se utilizan sobre distintos tipos de agar y de matrices, y para recuentos en superficie y recuentos en placas vertidas, para asegurar una discriminación adecuada de las colonias en estudio.

### **5.20.3 Verificación**

Las comprobaciones deberían realizarse periódicamente de forma manual, para asegurar que se consiguen unos recuentos precisos utilizando el contador de colonias.

Adicionalmente, los contadores de colonias automáticos deberían comprobarse todos los días de trabajo con una placa de calibración que contenga un número conocido de colonias o partículas contables.

### **5.20.4 Limpieza y mantenimiento**

Se mantiene el equipo limpio y sin polvo; se evita raspar las superficies que sean elementos esenciales del proceso de recuento. Se programa un mantenimiento periódico de los contadores electrónicos que incorporen analizadores de imagen, en las condiciones indicadas por el fabricante, con una frecuencia adecuada.

## **5.21 Equipamiento para cultivo en atmósfera modificada**

### **5.21.1 Descripción**

Puede ser un recipiente que se pueda sellar herméticamente o cualquier otro equipamiento que permita mantener unas condiciones atmosféricas modificadas (por ejemplo, anaerobiosis) a lo largo de todo el tiempo de incubación del medio de cultivo. Pueden utilizarse otros sistemas que consigan un resultado equivalente, como las cabinas de anaerobiosis.

Se siguen las indicaciones del fabricante para su instalación y mantenimiento.

### 5.21.2 Uso

La composición de la atmósfera requerida puede conseguirse mediante la adición de una mezcla de gases (procedentes por ejemplo de una bala de gases) tras la evacuación del aire del recipiente, por desplazamiento de la atmósfera en una cabina o mediante cualquier otro sistema adecuado (como los paquetes de gases comerciales disponibles en el mercado).

En general, la incubación anaeróbica requiere un atmósfera con una cantidad de oxígeno inferior al 1%, y del 9% al 13% de dióxido de carbono; la incubación microaeróbica (capnaeróbica) requiere una atmósfera de entre el 5% y el 7% de oxígeno y aproximadamente un 10% de dióxido de carbono.

Las condiciones pueden tener que modificarse en función de los requisitos específicos del microorganismo en concreto.

### 5.21.3 Verificación

Se introduce un indicador químico o biológico para monitorizar la naturaleza de la atmósfera en cada cámara durante cada uso. El crecimiento de una cepa de control o el cambio de color de un indicador químico verifica que se han conseguido unas condiciones de incubación adecuadas.

### 5.21.4 Mantenimiento

Si se utiliza un catalizador, éste se regenera periódicamente siguiendo las instrucciones del fabricante. Si se utilizan válvulas, se limpian y lubrican para asegurar que su funcionamiento es correcto, reemplazándolas cuando sea necesario.

El equipo se limpia y se higieniza de forma periódica.

## 5.22 Centrífuga

### 5.22.1 Descripción

Las centrífugas son sistemas mecánicos o electrónicos que utilizan la fuerza centrífuga para separar partículas suspendidas, incluidos los microorganismos, de los medios líquidos.

### 5.22.2 Uso

En algunas aplicaciones, se consigue concentrar el microorganismo objeto de estudio centrifugando muestras líquidas para conseguir un sedimento, que se puede resuspender en un medio líquido y someterse a un examen posterior.

Se toman las precauciones necesarias para prevenir la generación de aerosoles y la contaminación cruzada, mediante el uso adecuado del equipamiento y el empleo de botellas o tubos de centrifuga estériles y sellados.

### 5.22.3 Verificación

Cuando se especifica en la aplicación la velocidad de centrifugación, o es un parámetro crítico, los marcadores o el indicador de velocidad deberían comprobarse periódicamente, así como después de reparaciones o modificaciones importantes, utilizando un tacómetro calibrado e independiente.

### 5.22.4 Mantenimiento

Las centrífugas se limpian y desinfectan periódicamente, así como después de cualquier vertido de cultivos microbiológicos o de muestras potencialmente contaminadas.

Las centrífugas deberían revisarse periódicamente.

## 5.23 Placa calefactora y manta eléctrica

### 5.23.1 Descripción

Las placas calefactoras y las mantas eléctricas son sistemas de calentamiento controlados por un termostato. Algunas placas calefactoras y mantas eléctricas incorporan agitadores magnéticos.

### 5.23.2 Uso

Las placas calefactoras y las mantas eléctricas equipadas con agitadores magnéticos se utilizan para calentar volúmenes relativamente grandes de líquido, como es el caso de los medios.

No se utilizan placas calefactoras ni mantas eléctricas sin sistemas de agitación para la preparación de medios.

### 5.23.3 Mantenimiento

Se limpian todos los derrames tan pronto como la unidad se haya enfriado.

## 5.24 Sembrador espiral

### 5.24.1 Descripción

Un sembrador espiral es un dispensador que distribuye un volumen predeterminado de líquido sobre la superficie de una placa de agar en rotación. El brazo dispensador se mueve desde el centro de la placa hacia el borde exterior describiendo una espiral de Arquímedes. El volumen dispensado disminuye según la aguja dispensadora avanza desde el centro hacia el borde de la placa, de forma que existe una proporción inversa entre el volumen depositado y el radio de la espiral. El volumen de muestra dispensado en cualquier segmento definido es constante y conocido. Se necesita una fuente de vacío para cargar y dispensar los líquidos.

### 5.24.2 Uso

Este equipamiento se utiliza para dispensar una muestra líquida, una dilución o un homogenizado de una muestra a una placa de agar adecuada para efectuar un recuento de colonias. Tras la incubación, las colonias se desarrollan a lo largo de las líneas donde se ha depositado líquido. Se cuenta el número de colonias presentes en un área conocida utilizando una cuadrícula de recuento incluida junto con el equipo y se calcula el recuento total.

La superficie de las placas de agar que se utilizan con el sembrador espiral debe ser lisa y sin burbujas de aire.

Las placas deberían secarse con anterioridad a su uso para asegurar que no presentan un exceso de humedad.

El sistema de dispensado debería higienizarse y enjuagarse con agua estéril antes de cada muestra y después de cada uso.

### 5.24.3 Verificación

El ángulo de la punta de la aguja se comprueba diariamente utilizando una fuente de vacío para sujetar un cubreobjetos contra la aguja. El cubreobjetos debería quedar en posición paralela a 1 mm de la superficie del agar.

El patrón de dispensado debería verificarse dispensando tinta lavable. El patrón dibujado por el plaqueador espiral debería mostrar la máxima densidad cerca del centro de la placa, donde comienza la descarga y hacerse progresivamente menos denso al avanzar hacia el punto donde la aguja se levanta. La porción clara de la placa debería estar situada en la zona central y ser aproximadamente de 2,0 cm de diámetro.

Debería realizarse una comprobación diaria para asegurar que la punta de la aguja forma un ángulo correcto con la superficie del agar, utilizando el cubreobjetos y el indicador de nivel incluidos junto con el instrumento.

Debería verificarse la esterilidad del sembrador espiral para cada serie de muestras examinada, sembrando agua estéril.

Debería realizarse periódicamente una comprobación gravimétrica del volumen dispensado, utilizando agua destilada. La masa obtenida debería quedar incluida dentro del margen de error máximo permisible de  $\pm 5\%$  de la masa esperada para el volumen dispensado.

### 5.24.4 Mantenimiento

La aguja y el tubo capilar con los que se dispensa se pueden desinfectar inyectando una disolución que contenga entre un 0,5% y un 1% de cloro libre. A continuación debería hacerse pasar agua destilada o agua desionizada.



Las obstrucciones pueden prevenirse dejando que todas las partículas sedimenten antes de cargar la suspensión de la muestra, y empleando una porción del líquido sobrenadante.

Todos los vertidos deberían retirarse inmediatamente después de haberse producido, y el equipo debería limpiarse de forma periódica.

Este equipamiento debería revisarse y verificarse en función de su grado de utilización.

## **5.25 Destiladores, desionizadores y unidades de ósmosis inversa**

### **5.25.1 Descripción**

Estos equipos se utilizan para producir agua destilada o agua desionizada/desmineralizada de la calidad necesaria (véase la Especificación Técnica ISO/TS 11133) para la preparación de los reactivos o los medios de cultivo microbiológicos y para otras utilidades en el laboratorio.

### **5.25.2 Uso**

El equipo se instala, se pone en funcionamiento y se utiliza siguiendo las indicaciones del fabricante, teniendo en cuenta la situación de la toma de agua, del desagüe y de las tomas de electricidad.

### **5.25.3 Verificación**

Debe comprobarse que la conductividad del agua es satisfactoria de forma periódica, o cuando haya estado almacenada. Dicha conductividad no debe ser superior a 25  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (equivalente a una resistividad  $\geq 40\ 000\ \Omega\cdot\text{cm}$ ) cuando se utiliza para la preparación de medios y reactivos.

Si el agua se almacena antes de utilizarse o se genera mediante un intercambiador de iones, deberían realizarse controles de contaminación microbiana adecuados conforme a la Especificación Técnica ISO/TS 11133.

### **5.25.4 Mantenimiento**

Los destiladores deberían limpiarse y desincrustarse con una frecuencia que depende de la dureza del agua de entrada. Los desionizadores y las unidades de ósmosis inversa deberían someterse al mantenimiento indicado en las indicaciones del fabricante.

## **5.26 Temporizadores y dispositivos de control del tiempo**

### **5.26.1 Descripción**

Los temporizadores y los sistemas integrados de control del tiempo son instrumentos que permiten emplear los períodos de tiempo correctos para muchas de las aplicaciones del laboratorio en las que la duración de un proceso es crítica y está especificada.

### **5.26.2 Uso**

Los temporizadores analógicos o digitales, de mano o de mesa, utilizados para monitorizar la duración de las operaciones del laboratorio (por ejemplo la aplicación de tinciones sobre películas microbiológicas, homogeneización de muestras) deben estar en buenas condiciones de funcionamiento y ser capaces de conseguir la precisión necesaria.

Los temporizadores integrados en el equipamiento del laboratorio (por ejemplo autoclaves, centrifugas, homogeneizadores) se utilizan siguiendo las indicaciones del fabricante. Estos temporizadores deben ser capaces de conseguir la precisión necesaria.

### **5.26.3 Verificación**

Todos los temporizadores utilizados en las operaciones de laboratorio cuya duración es crítica para el resultado se comprueban respecto a las señales horarias nacionales, de forma periódica, así como después de cada reparación importante.

#### **5.26.4 Mantenimiento**

De forma periódica, los temporizadores se limpian y se comprueba que su funcionamiento es correcto.

Los sistemas integrados de control del tiempo deberían revisarse como parte del mantenimiento del propio instrumento.

### **5.27 Pipetas y pipeteadores**

#### **5.27.1 Descripción**

Las pipetas son sistemas de plástico desechable o de vidrio utilizados para dispensar volúmenes de líquidos o de materiales viscosos; las pipetas graduadas dispensan volúmenes medidos con una precisión que depende de sus especificaciones.

Los pipeteadores automáticos (mecánicos) que utilizan puntas de plástico son sistemas que dispensan volúmenes fijos o variables de líquidos, mediante la acción de un pistón que funciona de forma eléctrica o manual.

#### **5.27.2 Uso**

Se desechan las pipetas rotas o dañadas.

Las pipetas graduadas o Pasteur estériles y las puntas de los pipeteadores deberían incluir un tapón de algodón no absorbente para prevenir posibles contaminaciones cuando se utilizan con los cultivos microbiológicos.

No se pipetea con la boca en los laboratorios de microbiología, a excepción de los líquidos no contaminados.

Las peras utilizadas con las pipetas Pasteur o con las pipetas graduadas y las puntas de los pipeteadores deben ser del tamaño adecuado, para prevenir fugas y asegurar un funcionamiento eficaz.

#### **5.27.3 Verificación**

Se comprueba que las pipetas graduadas dispensan unos volúmenes correctos, si es que el fabricante no certifica su precisión (veracidad y precisión).

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

Los pipeteadores nuevos se comprueban antes de comenzar a utilizarlos, y de forma periódica según la frecuencia y naturaleza de su uso, para confirmar que respetan los errores máximos permisibles definidos en la Norma ISO 8655-1. Se realizan comprobaciones gravimétricas intermedias utilizando agua destilada o desionizada para asegurar que los volúmenes dispensados permanecen dentro de los errores máximos permisibles.

Se comprueban los lotes nuevos de pipetas graduadas.

#### **5.27.4 Mantenimiento**

Las pipetas no desechables y los pipeteadores automáticos se descontaminan y se limpian/esterilizan de la forma adecuada después de cada uso.

Si los émbolos o los pistones de los pipeteadores automáticos se contaminan durante su uso, se desmontan para su descontaminación y limpieza. Una vez vueltos a montar, se calibran de nuevo. Cuando esto no se puede realizar en el mismo laboratorio, los pipeteadores se devuelven al fabricante para su montaje y recalibración.

### **5.28 Termómetros y sistemas de control de la temperatura, incluyendo los registradores automáticos**

#### **5.28.1 Descripción**

Los termómetros son sistemas de mercurio introducido dentro de un vidrio o de alcohol introducido dentro de un vidrio que se utilizan para controlar la temperatura a lo largo del conjunto de actividades del laboratorio.

Otros sistemas de monitorización de la temperatura incluyen los termómetros de resistencia de platino y los instrumentos que utilizan termopares para medir la temperatura y proporcionar un registro visual, informático o electrónico de la variación de la temperatura a lo largo del tiempo.

Los termómetros y el resto de sistemas de monitorización de la temperatura de referencia deben calibrarse de acuerdo con los patrones nacionales o internacionales, y certificarse en este sentido. Deben utilizarse exclusivamente para servir como referencia y no deben utilizarse para monitorizaciones de rutina.

Los termómetros y el resto de sistemas de monitorización de la temperatura de trabajo deben calibrarse de forma que se permita su trazabilidad de acuerdo con los patrones nacionales e internacionales.

Los sistemas de una adecuada precisión que cumplan las especificaciones nacionales o internacionales correspondientes pueden utilizarse también como termómetros de trabajo tras la verificación de su correcto funcionamiento.

### 5.28.2 Uso

Los termómetros y el resto de sistemas de monitorización de la temperatura deben ser capaces de medir la temperatura requerida por la aplicación dentro de los errores máximos permisibles.

La incertidumbre de medida de los sistemas de monitorización de la temperatura debería ser cuatro veces inferior al intervalo de errores máximos permisibles aceptado. Por ejemplo, para un error máximo permisible de  $\pm 1$  °C, la incertidumbre de la medida debería ser de  $\pm 0,25$  °C; para un error máximo permisible de  $\pm 0,5$  °C, la incertidumbre de la medida debería ser de  $\pm 0,125$  °C. La incertidumbre de la medida en la calibración del termómetro de referencia también debería tomarse en consideración cuando se determina la temperatura de funcionamiento.

Los termómetros y los termopares colocados en el interior de los incubadores de aire deberían asegurarse dentro de recipientes adecuados rellenos de glicerol, parafina líquida o polipropilén glicol para amortiguar la pérdida de calor cuando se abre la puerta y proporcionar una lectura más estable.

Los termómetros de inmersión total se utilizan sólo con la ampolla sumergida.

Los termómetros de los baños de agua deberían estar sumergidos dentro del agua conforme a sus especificaciones concretas, es decir, los termómetros de inmersión parcial deberían sumergirse hasta la profundidad especificada para dicho termómetro, por ejemplo entre 76 mm y 100 mm.

No se utilizan los termómetros en los que la columna de mercurio o alcohol se ha roto.

Los termómetros de mercurio introducido dentro de un vidrio son frágiles y, si existe riesgo de rotura, deberían estar situados dentro de cajas de protección que no interfieran con las medidas de temperatura.

**ADVERTENCIA – El mercurio es peligroso para la salud. Los derrames se retiran siguiendo las legislaciones nacionales.**

### 5.28.3 Verificación

Los termómetros de referencia deben calibrarse para todo el intervalo completo utilizando patrones trazables nacionales o internacionales, antes de iniciar su uso y como mínimo cada cinco años. Debe realizarse una calibración de puntos singulares intermedios (por ejemplo el punto de congelación) para verificar su correcto funcionamiento.

Los termopares de referencia deben calibrarse de forma completa utilizando patrones trazables nacionales o internacionales, antes de iniciar su uso y siguiendo las indicaciones del fabricante. Debe realizarse una comprobación de los puntos intermedios respecto a un termómetro de referencia para verificar su correcto funcionamiento.

En el resto de los sistemas de monitorización de la temperatura (como los receptores de ondas de radio) deben calibrarse utilizando patrones trazables nacionales o internacionales, siguiendo las indicaciones del fabricante.

En los termómetros y los termopares de trabajo debería comprobarse el punto de congelación y/o compararse respecto a un termómetro de referencia dentro del intervalo de temperaturas de trabajo.

#### **5.28.4 Mantenimiento**

Los termómetros y los termopares se mantienen limpios y en buenas condiciones.

En el resto de sistemas de monitorización de la temperatura se sigue el mantenimiento indicado por el fabricante.

### **5.29 Separador inmunomagnético**

#### **5.29.1 Descripción**

Este equipamiento se utiliza para aislar y concentrar los microorganismos en estudio presentes en cultivos líquidos mediante partículas paramagnéticas recubiertas de un anticuerpo adecuado.

Los separadores manuales consisten en un mezclador giratorio capaz de alcanzar entre 12 r/min y 20 r/min y un concentrador de partículas con una barra magnética que se puede retirar.

Los separadores automáticos presentan una disposición de barras magnéticas y gradillas de tubos en forma de peine. Las partículas magnéticas se mueven de tubo a tubo y permiten que todo el proceso de separación, incluyendo los pasos de lavado, se realicen de forma automática en un entorno cerrado.

#### **5.29.2 Uso y verificación**

Se siguen las indicaciones de uso ofrecidas por el fabricante y las indicadas en las normas específicas (por ejemplo para *E.coli* O157).

En los sistemas manuales, se comprueba la velocidad de rotación del mezclador.

En los sistemas manuales y automáticos, se verifica que el sistema es capaz de aislar cantidades pequeñas del microorganismo en estudio antes de comenzar con el uso de rutina.

Es importante advertir la posibilidad de que se produzca contaminación cruzada durante los procesos de separación manual y tomar las medidas necesarias para evitar que esto ocurra.

#### **5.29.3 Mantenimiento**

La inspección y el mantenimiento de este equipamiento se realizan siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **5.30 Sistema de filtración**

Los sistemas de filtración utilizados deben ser los descritos en la Norma ISO 8199.

### **5.31 Otros equipos y programas informáticos**

El resto de los equipos y sus programas informáticos asociados deben ser capaces de alcanzar la precisión requerida y deben cumplir las especificaciones relacionadas con sus análisis. Deben establecerse programas de calibración con valores o cantidades clave, cuando estas propiedades tengan un efecto significativo sobre el resultado. Antes de comenzar con el uso de rutina, los equipos se comprueban o se calibran para determinar si cumplen con los requisitos del laboratorio y con las especificaciones de las normas relevantes. Todas las reconfiguraciones o modificaciones que se realicen en el laboratorio sobre los programas informáticos deben verificarse para asegurar que el programa modificado ofrece un resultado correcto.

## **6 PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO Y DEL RESTO DEL MATERIAL DE LABORATORIO**

### **6.1 Preparación**

El material de vidrio y el resto del material de laboratorio utilizado en microbiología deben ser de un diseño adecuado, utilizarse adecuadamente, y prepararse de forma que se garantice su limpieza y/o esterilidad hasta el momento de su uso.

Deberían estar diseñados para prevenir o limitar el contacto entre el analista y el material infeccioso.

Los tubos y botellas deberían cerrarse con tapones adecuados. En caso necesario, el material de vidrio que se va a esterilizar (por ejemplo las pipetas) debería colocarse en recipientes especiales o envolverse con un material apropiado (papel especial, papel de aluminio, etc.). El material de vidrio que se va a autoclavar vacío debería tener un acceso libre al vapor, ya que de no ser así, la esterilización no será efectiva.

## **6.2 Esterilización/descontaminación**

### **6.2.1 Generalidades**

Debería registrarse la temperatura y duración de la esterilización/descontaminación. Pueden utilizarse indicadores de esterilización para distinguir entre el material esterilizado y no esterilizado.

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

Se calienta el material de vidrio, etc. en el horno de esterilización durante un tiempo de cómo mínimo 1 h a 170 °C o en unas condiciones equivalentes.

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

El vapor húmedo a presión es el método más efectivo de esterilización del material de vidrio y del resto de material del laboratorio. La temperatura dentro de la cámara del autoclave debe mantenerse en 121 °C durante un tiempo de 15 min como mínimo (véase el apartado 5.6).

### **6.2.4 Descontaminación con productos químicos**

Los productos químicos (por ejemplo, los productos a base de cloro, alcoholes, compuestos de amonio cuaternario) se utilizan a las concentraciones adecuadas y durante un tiempo de contacto apropiado.

Se debe asegurar que los residuos de los compuestos químicos no afecten a la recuperación de microorganismos.

## **6.3 Equipamiento y materiales desechables**

Pueden utilizarse equipamiento y materiales desechables en lugar de equipamiento y materiales reutilizables (material de vidrio, placas de Petri, pipetas, botellas, tubos, asas de siembra, asas de extensión, etc.) si las especificaciones son similares.

Es aconsejable verificar que dicho equipamiento es adecuado para uso microbiológico (en particular, en referencia a su esterilidad) y que el material no contiene sustancias que inhiban el crecimiento de los microorganismos (véase la Norma ISO 9998).

## **6.4 Almacenamiento del material de vidrio y del resto del material de laboratorio limpio**

El material de vidrio y el resto del material de laboratorio limpio se protegen del polvo durante su almacenamiento, en condiciones que mantengan su limpieza.

## **6.5 Mantenimiento del material de vidrio y del resto del material de laboratorio estéril**

El material de vidrio y el resto del material de laboratorio se almacenan en condiciones que aseguren que se mantienen estériles. El equipamiento de un solo uso se almacena siguiendo las indicaciones del fabricante, sin estropear su embalaje. El equipamiento preparado en el laboratorio se almacena en condiciones limpias.

Cuando se esteriliza equipamiento destinado a microbiología se indica una fecha de caducidad (o una fecha de fabricación) en cada paquete.

## 6.6 Descontaminación y desinfección

### 6.6.1 Descontaminación del equipamiento desechable

El equipamiento desechable se descontamina con anterioridad a su eliminación.

Además de los métodos descritos en este capítulo, puede utilizarse la incineración. Si hay un incinerador en las mismas instalaciones, la descontaminación y la eliminación se pueden realizar en un solo paso.

### 6.6.2 Descontaminación del material de vidrio y del resto del material de laboratorio antes de su uso

De forma general, la esterilización de este equipamiento debería realizarse mediante calor húmedo (véase el apartado 6.2.3) o mediante calor seco (véase el apartado 6.2.2).

En determinadas circunstancias (por ejemplo durante la toma de muestras de campo), puede resultar adecuada la descontaminación química. Después de dicho tratamiento, el equipamiento debería quedar libre de sustancias inhibidoras.

### 6.6.3 Descontaminación del material de vidrio y del resto del material de laboratorio con posterioridad a su uso

Los materiales destinados a descontaminación y eliminación deberían colocarse en recipientes, como por ejemplo bolsas de plástico autoclavables. El autoclavado es el método de preferencia para todos los procesos de descontaminación (como mínimo 30 min a 121 °C). El autoclave debería llenarse de forma que se favorezca la penetración de calor dentro de la carga (es decir, sin sobrecargarlo) y tomando la precaución de aflojar los tapones o las tapas y de abrir las bolsas.

Pueden utilizarse métodos alternativos distintos del autoclavado, siempre que cumplan las regulaciones nacionales.

Se autoclava todo el equipamiento que haya entrado en contacto con los cultivos microbiológicos (medios de cultivo líquidos o sólidos), incluyendo los recipientes reutilizables, antes de llevarse a lavar.

Durante los análisis, puede utilizarse la descontaminación por inmersión en diluciones de desinfectantes recién preparadas para el equipamiento de pequeño tamaño y resistente a la corrosión (por ejemplo las pipetas).

Las pipetas Pasteur se utilizan una sola vez.

La mayoría de los desinfectantes (véase el anexo A) presentan algunos efectos tóxicos. Se utilizan guantes y protección ocular cuando se manipulen desinfectantes concentrados.

## 6.7 Tratamiento de residuos

Una correcta eliminación del material contaminado no afecta directamente a la calidad del análisis de las muestras, pero es una indicación de una buena gestión del laboratorio.

Deberían cumplirse las disposiciones nacionales sobre medio ambiente o sobre salud y seguridad.

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

- residuos no contaminados (por ejemplo muestras de alimentos que no han sido cultivadas) que se pueden eliminar junto con los residuos generales,
- escalpelos, agujas, cuchillas, vidrio roto,
- material contaminado para autoclavado y reciclado, y
- material contaminado para autoclavado y eliminación, o solamente para eliminación si el material se va a incinerar (no obstante, consúltense los requisitos especiales para los microorganismos de nivel de seguridad 3 indicados más adelante).

La incineración del material contaminado, junto con sus recipientes, debería realizarse siguiendo las legislaciones nacionales sobre medio ambiente o sobre salud y seguridad.

El material contaminado con microorganismos de nivel de seguridad 3 y sus recipientes deben autoclavarse antes de ser incinerados.

## **6.8 Lavado**

El equipamiento reutilizable solamente se lava después de haber sido descontaminado. Después de haberse lavado, todos el equipamiento se enjuaga con agua desionizada.

Puede utilizarse equipamiento especializado para facilitar las operaciones de limpieza (por ejemplo, lavadores de pipetas, lavavajillas, baños de ultrasonidos).

Después de haberse lavado, el equipamiento reutilizable debe haber quedado libre de residuos que puedan afectar al posterior crecimiento de los microorganismos.

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

Los medios de cultivo se preparan y esterilizan conforme a las Normas ISO/TS 11133-1 e ISO/TS 11133-2.

## **8 MUESTRAS DE LABORATORIO**

### **8.1 Toma de muestras**

#### **8.1.1 Generalidades**

Aunque de enorme importancia para la interpretación de los resultados, la toma de muestras y el programa de toma de muestras no forman parte de esta norma internacional. Es importante que el laboratorio reciba una muestra que sea representativa del lote del producto y que no haya sufrido daño o transformación durante el transporte o el almacenamiento.

La muestra debería protegerse de contaminaciones externas ocasionadas por el aire, el recipiente de la muestra, los equipos de toma de muestras o por una incorrecta manipulación. El recipiente de la muestra no debería llenarse en más de tres cuartas partes de su capacidad para evitar posibles vertidos y para favorecer que la muestra se pueda mezclar correctamente en el laboratorio.

Las muestras se identifican de manera clara y completa, y se registra la información sobre la muestra.

Frecuentemente, la información sobre la temperatura durante la recogida de la muestra y en el momento de su recepción es útil para el laboratorio a la hora de interpretar los resultados.

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

Si el producto es voluminoso o se encuentra en un recipiente demasiado grande para poderse enviar al laboratorio, se transfiere en condiciones asépticas una alícuota a un recipiente para muestras estéril.

El recipiente para muestras estéril debería abrirse exclusivamente durante el tiempo mínimo necesario para introducir la muestra, cerrándose inmediatamente después.

#### **8.1.2 Programa de toma de muestras**

La toma de muestras no forma parte de esta norma internacional. Véase la norma internacional específica relacionada con cada producto en concreto, si se dispone de ella.

### **8.2 Transporte**

La forma de transporte de las muestras al laboratorio debe asegurar que se mantienen en condiciones que minimicen cualquier tipo de alteración en el número de microorganismos presentes.

Las muestras se envían al laboratorio con prontitud, manteniendo unas condiciones lo más parecidas posible a las condiciones de almacenamiento originales.

La muestra debería empaquetarse de forma que se eviten roturas o derrames.

La etiqueta del producto debería indicar si se necesita refrigeración.

Las muestras que no necesiten refrigeración o congelación pueden embalsarse en un recipiente utilizando un material de embalado adecuado que impida su rotura.

No se utiliza hielo suelto ya que puede producir contaminación si el recipiente se rompe o tiene fugas.

Salvo que las normas específicas indiquen lo contrario (véanse por ejemplo las Normas ISO 6887 e ISO 8261), se recomiendan las siguientes temperaturas de transporte:

- productos estables: temperatura ambiente (por debajo de 40 °C);
- productos congelados o ultracongelados: menos de –15 °C, preferiblemente menos de –18 °C;
- otros productos inestables a temperatura ambiente: entre 1 °C y 8 °C;
- muestras recogidas en materiales absorbentes: véanse las Normas ISO 18593 e ISO 17604.

Cuando no especifique ninguna condición en particular, se recomienda que las partes interesadas lleguen a un acuerdo sobre la duración y la temperatura del transporte.

### 8.3 Recepción

Se comprueba el estado de las muestras cuando se efectúa su recepción.

Si sus condiciones no son satisfactorias, o si las muestras son insuficientes, el laboratorio debería rechazar las muestras.

En circunstancias especiales, pueden analizarse, tras discusión y acuerdo con el cliente.

No obstante, el informe del análisis debe mostrar reservas sobre la validez de los resultados.

Las muestras admitidas en el laboratorio se documentan de manera que se pueda seguir su evolución a lo largo del tiempo hasta el momento de elaborar el informe del análisis. La identidad y codificación de las muestras y los registros deben asegurar su trazabilidad a lo largo de todas las etapas de su paso por el laboratorio.

En caso necesario, las superficies externas de los recipientes deberían desinfectarse utilizando un desinfectante adecuado.

Se revisan los recipientes de las muestras en busca de defectos físicos aparentes.

Se registra la siguiente información:

- fecha (y hora, cuando sea relevante) de la recepción;
- detalles sobre la toma de muestras (día y hora de toma de muestras, cuando sea relevante y se conozca, estado de las muestras);
- nombre y dirección del cliente.

Al efectuar la recepción de muestras perecederas, se registra la temperatura del transporte o la temperatura de una muestra ficticia incluida con esta finalidad.



Las muestras se analizan lo antes posible tras su recepción, preferiblemente en un plazo de 24 h, o según se haya acordado entre las partes interesadas.

Para los productos altamente perecederos (como el marisco), los análisis deberían iniciarse en un plazo de 24 h desde la toma de muestras. Para los productos perecederos (como el pescado, la leche cruda), los análisis deberían iniciarse en un plazo de 36 h.

Si no se pueden cumplir los plazos mencionados anteriormente, las muestras pueden congelarse a una temperatura inferior a  $-15\text{ °C}$ , preferiblemente a  $-18\text{ °C}$ , siempre que se haya demostrado que la recuperación de el(los) microorganismo(s) estudiado(s) no se reduce de forma significativa en ese tipo concreto de matriz.

#### **8.4 Almacenamiento**

Las muestras que se encuentran esperando ser analizadas se almacenan en condiciones que minimicen cualquier tipo de cambio en el número de microorganismos presentes.

Se recomiendan las siguientes temperaturas de almacenamiento:

- productos estables: temperatura ambiente (entre  $18\text{ °C}$  y  $27\text{ °C}$ );
- productos congelados o ultracongelados: menos de  $-15\text{ °C}$ , preferiblemente menos de  $-18\text{ °C}$ ;
- otros productos inestables a temperatura ambiente, incluidos los alimentos estropeados:  $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  (véanse las Normas ISO 6887-4 o ISO 8261);
- muestras recogidas en material absorbente: véanse las Normas ISO 18593 e ISO 17604.

#### **8.5 Porción para análisis**

##### **8.5.1 Reglas específicas sobre la recogida de porciones de análisis**

Se consulta la parte correspondiente de las Normas ISO 6887, o ISO 8261, sobre las reglas específicas para la recogida de las porciones de análisis, la preparación del homogenizado y la suspensión inicial.

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

Salvo en casos especiales, las muestras de laboratorio se conservan hasta que se hayan obtenido todos los resultados, o durante un tiempo mayor si fuera necesario, se empaquetan en un recipiente estéril (por ejemplo una bolsa de plástico) y se devuelven a su temperatura de almacenamiento original.

Los productos perecederos deberían congelarse.

NOTA La repetición de los análisis no es una práctica aceptada habitualmente, debido a los posibles cambios en su situación microbiológica.

## **9 ANÁLISIS**

### **9.1 Precauciones de carácter higiénico durante los análisis**

Para evitar la contaminación del medio ambiente y de las porciones de análisis, los productos pulverizados (deshidratados) se manipulan en un área distinta o en una habitación separada o en una cabina de protección.

Antes de abrir las muestras normales, se humedece la zona próxima al lugar previsto de apertura con alcohol al 70% (en volumen) (u otro producto equivalente) y se deja evaporar. Antes de proceder a abrir los paquetes estériles, se sumerge la superficie por donde se va a abrir en una disolución que contenga entre 100 ppm y 200 ppm de cloro libre (o algún otro esterilizante adecuado) durante un tiempo de cómo mínimo 10 min para destruir los microorganismos que pudieran contaminar la muestra.

Todos los instrumentos utilizados para abrir los paquetes y retirar parte o la totalidad de la muestra (abrelatas, tijeras, espátulas, pinzas, pipetas, etc.) deben ser estériles.

El área de trabajo próxima debería limpiarse y humedecerse con un desinfectante adecuado antes de comenzar los análisis.

Deberían lavarse las manos inmediatamente antes de comenzar los análisis, y también durante su desarrollo, si se llegan a contaminar.

Todos los instrumentos utilizados deberían ser estériles y protegidos de la exposición a la contaminación antes y durante su uso.

Todos los instrumentos y utensilios empleados deberían colocarse en recipientes adecuados para su posterior eliminación o esterilización.

Se adoptan las medidas necesarias para que el trabajo se desarrolle, en la medida de lo posible, en condiciones asépticas. Por ejemplo:

- a) se asegura que el área de trabajo se mantiene limpia, que todas las fuentes potenciales de contaminación se han eliminado o reducido al mínimo y que no hay corrientes de aire (es decir, que las puertas y ventanas permanecen cerradas). Se evita el movimiento innecesario de personas durante el análisis;
- b) antes y después del análisis, se descontamina la superficie de trabajo con un desinfectante adecuado;
- c) antes de comenzar con el trabajo, se asegura que todo lo necesario para realizar el trabajo (y solamente eso) está disponible;
- d) el trabajo se realiza sin demoras;
- e) se separan las actividades “limpias” y “sucias” en tiempo y lugar (esto es especialmente importante para muestras de alto riesgo como la carne cruda y los huevos crudos);
- f) se utiliza equipamiento desechable;
- g) si no se utiliza todo el contenido de un paquete de placas de Petri, pipetas, etc. desechables durante el desarrollo de un análisis, se asegura que el paquete queda bien cerrado después de haber retirado el número de unidades necesarias;
- h) se absorbe inmediatamente todo tipo de vertido utilizando toallitas de algodón o de cualquier otro material adecuado, impregnadas en etanol al 70% (en volumen) o cualquier otro desinfectante adecuado<sup>1)</sup>. A continuación, se limpia y se desinfecta la superficie de trabajo antes de proseguir;
- i) se utiliza una cabina de seguridad para la manipulación de productos que puedan contener bacterias patogénicas, si las regulaciones nacionales lo requieren;
- j) cuando se retira una pipeta estéril de una caja, no se deja que la punta toque las superficies externas de las otras pipetas de la caja porque dichas superficies son objeto de contaminación;
- k) no se permite que la pipeta toque el borde o el cuello de las botellas de dilución.

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

- cuando se abren las placas de Petri, los tubos y las botellas;
- cuando se utilizan agitadores, jeringas, centrifugas, etc.;
- cuando se vacían las pipetas;
- cuando se esterilizan agujas o asas de siembra mojadas;
- cuando se abren ampollas que contienen cultivos liofilizados.

---

1) Cuando se utilizan desinfectantes distintos al etanol al 70% (en volumen), se necesitan tiempos de contacto adecuados, definidos en las indicaciones del fabricante, para un desinfección eficaz.

Por consiguiente, su formación debe reducirse al máximo.

Para algunos métodos en particular, se toman las precauciones adicionales indicadas en la Norma ISO 22174.

## **9.2 Preparación de las suspensión inicial y de las diluciones**

### **9.2.1 Generalidades**

Las suspensión inicial y las diluciones se preparan conforme a la parte correspondiente de la Norma ISO 6887 o ISO 8261. El tiempo transcurrido desde el final de la preparación de la suspensión inicial y el momento en el que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe ser superior a 45 min, salvo que se mencione específicamente algo distinto en la norma internacional correspondiente.

Los procesos de preparación de la suspensión inicial y de las diluciones pueden ir seguidos de una etapa de enriquecimiento, según se describe en las normas específicas.

### **9.2.2 Concentración**

#### **9.2.2.1 Centrifugación o filtración en membrana**

Si se necesita hacer un recuento de microorganismos presentes en un número reducido, el recuento puede mejorarse, tanto en sensibilidad como en precisión, introduciendo una etapa de enriquecimiento de la porción de análisis. La concentración se puede conseguir mediante centrifugación o mediante filtración en membrana.

Si se emplea la centrifugación, el sedimento centrifugado se resuspende en un volumen conocido de diluyente y se continúa con el análisis.

Para cada combinación considerada (de alimento más microorganismo), debe realizarse un estudio previo (véase por ejemplo la referencia [23] de la bibliografía), para demostrar si la inclusión de la etapa de concentración es válida y necesaria. Debe evaluarse la filtrabilidad de las suspensiones de los alimentos.

Debe verificarse el funcionamiento global del método, en términos de sensibilidad, selectividad, linealidad y repetibilidad. Si no se conoce el nivel de contaminación, debería realizarse en paralelo el método normal (sin filtración).

#### **9.2.2.2 Inmunoseparación**

Si el número de microorganismos objeto de estudio presentes en la muestra es bajo, puede conseguirse su separación y concentración utilizando partículas inmunomagnéticas recubiertas de anticuerpos específicos.

Se extienden directamente las partículas junto con los microorganismos capturados en un medio sólido específico, conforme a las normas específicas. Se debe verificar la idoneidad de las partículas inmunomagnéticas recubiertas con los anticuerpos específicos utilizadas para esta etapa de concentración son adecuadas, según estudios de evaluación publicados en la literatura científica internacional, preferiblemente relacionada con la microbiología de los alimentos. Esta verificación es especialmente importante si el procedimiento no se ha validado conforme a la Norma ISO 16140.

## **10 RECuento**

### **10.1 Generalidades**

Cuando se determina la seguridad y/o la calidad microbiológica de los alimentos y los productos alimenticios, conocer solamente qué microorganismos están presentes no suele ser suficiente. En la mayor parte de los casos, el aspecto cuantitativo es igualmente importante, por lo que se hace necesario el recuento de microorganismos. El recuento se puede realizar de diversas formas: por examen directo (microscopía), mediante inoculación en medios sólidos o líquidos, mediante citometría de flujo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real, etc. Sin embargo, esta norma internacional solamente trata el recuento en medios sólidos y líquidos.

El recuento en medio sólido se basa en la capacidad de muchos microorganismos de producir colonias dentro o sobre la superficie de los medios de agar, que se pueden reconocer como tales a simple vista o con la ayuda de una lente de aumento. Sin embargo, si la matriz contiene muchas partículas que puedan interferir con la detección de las colonias, o si el nivel de bacterias es muy bajo, este principio no se puede utilizar sin separar antes los microorganismos estudiados de la matriz (por ejemplo mediante filtración o mediante inmunoseparación). En estos casos, el recuento en medios líquidos es una alternativa razonable.

## **10.2 Recuento en medio sólido**

### **10.2.1 Generalidades**

La placa de Petri debería estar rotulada con el número de la muestra, la dilución, la fecha y cualquier otra información que se desee incluir.

Deberían seleccionarse las diluciones adecuadas que aseguren que las placas contienen un número adecuado de colonias (véase el apartado 10.3.1), y para evitar posibles problemas de inhibición.

Se utilizan pipetas estériles diferentes para transferir las distintas diluciones, salvo si se trabaja desde la más diluida a la más concentrada.

### **10.2.2 Número de placas de Petri para cada dilución**

En las técnicas de recuento para microbiología de los alimentos, debe utilizarse una placa por dilución para un mínimo de dos diluciones consecutivas si el laboratorio trabaja bajo un sistema de garantía de la calidad, conforme a los principios de la Norma ISO 17025. Si se realiza solamente una dilución, o si el laboratorio no trabaja en condiciones de garantía de la calidad, deben utilizarse dos placas, conforme a la Norma ISO 8199.

### **10.2.3 Técnicas de siembra en profundidad**

#### **10.2.3.1 Generalidades**

Se recogen los volúmenes adecuados a la dilución que se va a examinar, haciendo tocar a la punta de la pipeta contra el lateral del tubo para eliminar el exceso de líquido que pudiera haberse quedado en la parte externa. Se levanta la tapa de la placa de Petri la altura justa para introducir la pipeta, y se dispensa a continuación su contenido. Se vierte sobre cada placa de Petri el medio de agar fundido, a una temperatura de entre 44 °C y 47 °C<sup>2)</sup>. Se evita verter directamente el medio sobre el inóculo. Se mezcla inmediatamente con suavidad el medio fundido con el inóculo, para conseguir una distribución homogénea de los microorganismos dentro del medio. Se deja enfriar y solidificar colocando la placa de Petri sobre una superficie horizontal fría (el tiempo de solidificación del agar no debe ser superior a 10 min).

Cuando se retira el medio de agar fundido del baño de agua, se seca la botella con una toallita limpia para evitar que el agua contamine las placas. Se evita que el medio salpique fuera del recipiente o en el interior de la tapa de las placas cuando se está vertiendo.

Esto puede requerir mantener la botella en una posición casi horizontal y no apoyar la botella entre vertido y vertido.

Si se sospecha la presencia de colonias con capacidad invasiva en el producto que se está analizando (por ejemplo de *Proteus* spp.), las placas solidificadas se recubren con agar no-nutritivo estéril, o con un agar idéntico al del medio de cultivo utilizado en el análisis<sup>3)</sup>, para evitar o minimizar la diseminación.

---

2) Lo normal es un volumen de entre 18 ml y 20 ml de agar en placas de Petri de 90 mm, para conseguir un espesor de cómo mínimo 3 cm.

3) Lo normal es un volumen de 5 ml de agar en placas de Petri de 90 mm.

## 10.2.4 Inoculación en superficie

### 10.2.4.1 Generalidades

Los métodos de plaqueo diseñados para obtener solamente colonias en la superficie de las placas de agar presentan ciertas ventajas sobre el método de placas de agar en profundidad. La morfología de las colonias de superficie se observa con facilidad, aumentando la capacidad del analista para distinguir entre distintos tipos de colonias.

Los microorganismos no se exponen al calor del medio de agar fundido, por lo que pueden conseguirse recuentos más altos.

Se utilizan placas previamente vertidas, con un medio de agar de cómo mínimo 3 mm de espesor, planas y sin burbujas de aire ni humedad en su superficie.

Para facilitar que su extensión sea uniforme, la superficie del agar solidificado debería secarse conforme a la Especificación Técnica ISO/TS 11133, o según se especifique en la norma internacional correspondiente, de forma que el inóculo se absorba en un plazo de 15 min.

### 10.2.4.2 Método del asa de extensión

Utilizando una pipeta estéril, se transfiere el inóculo (generalmente, entre 0,1 ml y 0,5 ml) de la muestra para análisis, cuando ésta es líquida, o de la suspensión inicial, para el resto de las muestras, en la placa de agar (de 90 mm o de 140 mm de diámetro, respectivamente). Se repite este paso para la siguiente dilución decimal (las colonias que se van a contar estarán presentes en una dilución de  $10^{-1}$  para las muestras de materiales líquidos y de  $10^{-2}$  para las muestras del resto de materiales). Si es necesario, se repite con diluciones decimales adicionales.

Si en algún producto es necesario detectar recuentos microbianos pequeños, el límite de detección puede aumentarse en un factor de 10 analizando 1,0 ml de muestra, para los productos líquidos, y 1,0 ml de la suspensión inicial para el resto de productos. En este caso, se extiende 1,0 ml del inóculo sobre la superficie de una placa de agar grande (de 140 mm de diámetro) o sobre la superficie de tres placas de agar pequeñas (de 90 mm de diámetro).

Utilizando un asa de extensión de vidrio, plástico o acero (por ejemplo fabricada a partir de una varilla de vidrio a la que se ha dado la forma de un palo de hockey de unos 3,5 cm de diámetro y 20 cm de longitud, doblada formando un ángulo recto aproximadamente a 3 cm de uno de los extremos y con los extremos alisados por calentamiento), se extiende el inóculo lo más deprisa posible de forma homogénea sobre la superficie del agar, sin tocar las paredes de la placa de Petri. Se deja absorber el inóculo durante unos 15 min a temperatura ambiente con las tapas de las placas puestas.

En algunas ocasiones (como se indica en la correspondiente norma internacional), el inóculo se puede depositar sobre una membrana y a continuación extenderse según se ha descrito anteriormente.

### 10.2.4.3 Método de siembra en espiral

#### 10.2.4.3.1 Generalidades

El método de siembra en espiral aplicado a la determinación del nivel de microorganismos se ha ensayado en estudios interlaboratorios con leche y productos lácteos y con otros alimentos.

El equipamiento utilizado – el plaqueador en espiral- se describe en el apartado 5.24.

#### 10.2.4.3.2 Preparación de la placa de agar

Para ayudar a asegurar que la superficie de las placas queda lisa, se recomienda utilizar para la preparación de las placas de agar un dispensador automático con un sistema de reparto en condiciones estériles.

Se vierte la misma cantidad de agar en todas las placas, de forma que la aguja del sembrador en espiral encuentre siempre la misma altura de agar, para mantener un ángulo de contacto correcto.

Alternativamente, pueden utilizarse placas de agar comerciales listas para usar.

#### 10.2.4.3.3 Procedimiento de siembra y recuento

Se descontaminan la punta de la aguja y el tubo capilar haciendo pasar a través del sistema en primer lugar disolución de hipoclorito sódico (véase el apartado 5.24.4) y a continuación agua estéril, antes de hacer pasar la muestra líquida por la aguja.

Se coloca una placa de agar previamente vertida en una placa Petri en el plato giratorio y se baja la aguja. La muestra se dispersa de forma diferencial según la punta de la aguja se desplaza por la superficie de la placa de agar en rotación. Se retira la placa inoculada y se devuelve la aguja a su posición inicial. Se descontamina la aguja y se carga para la inoculación de otra placa.

Tras la incubación, se centra la cuadrícula de recuento de las placas en espiral en su posición. Se utiliza la regla de recuento de 20 para contar el número de colonias. Se escoge cualquiera de las cuñas y se empiezan a contar colonias desde el borde exterior del primer segmento hacia el centro, hasta que se hayan contado 20 colonias. Se completa contando el resto de colonias presentes en el segmento que contiene la colonia número veinte. Se realiza el recuento en un área similar situada en el extremo opuesto de la placa y se divide el número de colonias contadas en ambas partes por el volumen de muestra depositada en esas dos áreas. Los volúmenes de muestra asociados a cada porción de la cuadrícula de recuento se indican en el manual de instrucciones que acompaña a cada plaqueador espiral.

#### 10.2.5 Incubación

Salvo que las normas específicas indiquen lo contrario, las placas se invierten inmediatamente después de haberse inoculado y se llevan rápidamente a un incubador mantenido a la temperatura correspondiente. Si se produce un exceso de deshidratación (por ejemplo a 55 °C o por una fuerte circulación de aire), las placas se envuelven antes de su incubación en bolsas de plástico poco apretadas, o se emplea un sistema de eficacia equivalente.

Durante el período de incubación, es inevitable, y aceptable, que se produzcan pequeñas fluctuaciones en la temperatura de incubación, por ejemplo durante las operaciones normales de carga y descarga del incubador, pero es importante que estos períodos se reduzcan al mínimo. La duración de dichas fluctuaciones debería monitorizarse para asegurar que no ejercen un efecto significativo sobre los resultados.

NOTA En algunos casos, puede ser útil para el recuento mantener las placas inoculadas a  $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  para poderlas comparar con las placas inoculadas incubadas, para evitar que determinadas partículas del producto estudiado puedan confundirse con colonias. El uso de una lente binocular de aumento también puede ayudar a distinguir las partículas del producto estudiado de las colonias.

En algunas circunstancias, puede ser mejor para la organización del trabajo en el laboratorio refrigerar las placas inoculadas durante un tiempo máximo de 24 h antes de la incubación. En este caso, el laboratorio debe asegurar que esta práctica no afecta al resultado del recuento.

De forma general, las placas de Petri no deberían apilarse en más de seis alturas para la incubación aeróbica, y deberían separarse unas de otras y de las paredes del incubador en una distancia de 25 mm como mínimo. Sin embargo, sí es aceptable apilar alturas mayores y dejar espacios más reducidos cuando los incubadores disponen de sistemas de circulación de aire; en este caso, debería verificarse la distribución de la temperatura.

Habitualmente, las placas deberían examinarse inmediatamente después de la incubación. Sin embargo, y salvo que las normas específicas indiquen lo contrario, pueden almacenarse en la nevera durante un tiempo de hasta 48 h. Solamente es aceptable un almacenamiento refrigerado durante períodos más prolongados si se ha demostrado que no afecta al número, la apariencia o la subsiguiente confirmación de las colonias. Cuando los medios contienen colorantes indicadores, las placas deberían dejarse equilibrar a temperatura ambiente antes de examinarse, para asegurar que se recupera el color correcto.

### 10.3 Cálculo y expresión de los resultados obtenidos con los medios sólidos

#### 10.3.1 Recuento de colonias

Después del período de incubación establecido en la norma específica, se cuentan las colonias (colonias totales, colonias típicas o colonias sospechosas) de cada placa que contenga menos de 300 colonias (u otra cantidad, establecida en la norma específica).

Cuando se haga el recuento de colonias típicas o colonias sospechosas, la norma específica debe ofrecer una descripción de las colonias.

En algunos casos, puede ser difícil hacer un recuento de colonias (por ejemplo cuando existan microorganismos con capacidad invasiva). Las colonias diseminadas se consideran como colonias únicas. Si hay menos de un cuarto de la placa sobrecrecida por la diseminación, las colonias se cuentan en la parte no afectada de la placa, y se calcula el número de colonias de la placa entera, deduciéndolo por extrapolación del número teórico que debería corresponder a la placa entera. Si hay sobrecrecimiento en un área superior a un cuarto de la placa, se rechaza este recuento. Las colonias dispuestas en forma de rosario se consideran como una sola colonia.

En los distintos métodos de cálculo mostrados en el apartado 10.3.2, deben tenerse en cuenta las placas que no contienen colonias, cuando se escojan dichas placas.

Cuando se haya utilizado un sembrador espiral, el recuento de colonias se realiza según se indica en el apartado 10.2.4.3.3.

### 10.3.2 Expresión de los resultados

#### 10.3.2.1 Generalidades

**10.3.2.1.1** Los casos considerados en este apartado son casos generales:

- inoculación de una placa de Petri de 90 mm de diámetro por cada dilución;
- recuento máximo de colonias totales presentes: 300 por placa;
- número máximo total de colonias (típicas y atípicas) de una placa cuando se recuentan colonias típicas y colonias sospechosas: preferiblemente 300 por placa;
- recuento máximo de colonias típicas o sospechosas: 150 por placa;
- número de colonias sospechosas inoculadas para su identificación o confirmación (véase el apartado 10.3.2.3) de cada placa escogida: de forma general, 5.

Estas cifras se definen en las normas específicas.

Cuando se utilizan placas de un diámetro diferente a 90 mm, el número máximo de colonias debe aumentarse o reducirse proporcionalmente al área de la superficie de las placas (o membranas).

**10.3.2.1.2** Los métodos de cálculo indicados a continuación corresponden a los casos que se presentan con mayor frecuencia cuando los análisis se realizan siguiendo unas buenas prácticas de laboratorio. Ocasionalmente, pueden producirse excepciones (por ejemplo, que los factores de dilución de dos diluciones consecutivas sean diferentes), por lo que resulta necesario que los resultados del recuento sean examinados e interpretados por un microbiólogo cualificado, y en su caso, rechazados.

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

Para que un resultado sea válido, se suele considerar necesario que el recuento de colonias se realice al menos en una placa que contenga un mínimo de 10 colonias [colonias totales, colonias típicas o colonias que cumplan los criterios de identificación (véase el apartado 10.3.2.3)].

El número de microorganismos  $N$  presentes en la muestra para análisis se calcula como la media corregida de dos diluciones consecutivas, utilizando la ecuación (1):

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

donde

$\sum C$  es la suma de las colonias contadas en las dos placas escogidas de las dos diluciones consecutivas, de las cuales al menos una contiene un mínimo de 10 colonias;

$V$  es el volumen de inóculo utilizado en cada placa, en mililitros;

$d$  es la dilución correspondiente a la primera dilución escogida [ $d = 1$  cuando se utiliza en el producto líquido sin diluir (para muestras líquidas)].

El resultado calculado se redondea a dos cifras significativas. Cuando se realiza esta operación, si la tercera cifra es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior; si la tercera cifra es igual o superior a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad.

Preferiblemente, el resultado se expresa como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada, o como un número entero con dos cifras significativas.

El resultado se expresa como número de microorganismos  $N$  por mililitro (para los productos líquidos) o por gramo (para el resto de productos).

EJEMPLO El recuento ha proporcionado los siguientes resultados:

- para la primera dilución escogida ( $10^{-2}$ ): 168 colonias;
- para la segunda dilución escogida ( $10^{-3}$ ): 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 indicó anteriormente, el número de microorganismos es de 17 000 o  $1,7 \times 10^4$  por mililitro o por gramos de producto.

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

Cuando el método utilizado requiere identificación, se identifica un número determinado  $A$  de colonias sospechosas (generalmente 5) de cada placa escogida para el recuento de colonias. Tras la identificación, se calcula el número de colonias de cada placa,  $a$ , que cumplen los criterios de identificación, utilizando la ecuación (2):

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

donde

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

$C$  es el número total de colonias sospechosas contadas en cada placa.

El resultado calculado se aproxima al número entero más próximo. Cuando se realiza esta operación, si la primera cifra decimal es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior; si la primera cifra decimal es igual o superior a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad.

El número de microorganismos identificados  $N$  presentes en la muestra para análisis se calcula reemplazando  $\sum C$  por  $\sum a$  en la ecuación indicada en el apartado 10.3.2.2.

El resultado se redondea según se indica en el apartado 10.3.2.2.

El resultado se expresa según se indica en el apartado 10.3.2.2.

EJEMPLO El recuento ha proporcionado los siguientes resultados:

- para la primera dilución escogida ( $10^{-3}$ ): 66 colonias;
- para la segunda dilución escogida ( $10^{-4}$ ): 4 colonias.



Realizando el análisis de las colonias escogidas:

- de las 66 colonias, se analizaron 8, de las que 6 cumplieron los criterios; por consiguiente  $a = 50$ ;
- de las 4 colonias, las 4 cumplieron los criterios; por consiguiente  $a = 4$ .

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

Redondeando el resultado como se indicó en el apartado 10.3.2.2, el número de microorganismos es de 49 000 o  $4,9 \times 10^4$  por mililitro o por gramo de producto.

#### 10.3.2.4 Método de cálculo: recuento bajo

##### 10.3.2.4.1 Caso en el que una placa (muestra para análisis o suspensión inicial o primera dilución) contiene menos de 10 colonias

El intervalo óptimo de precisión corresponde a un recuento de entre 10 y el límite (práctico) superior de cada método. Por otra parte, la precisión disminuye rápidamente al reducirse el número de colonias por debajo de un valor de 10. En función del objetivo del análisis, se puede definir un límite de determinación inferior basado en un recuento inferior a 10.

Conforme al Informe Técnico ISO/TR 13843, la definición del límite de determinación es: “la concentración media de partículas más baja  $x$  por porción analítica para la que la incertidumbre estándar relativa esperada es igual a un valor definido (RSD)”. RSD es la desviación estándar relativa, que se calcula dividiendo la desviación estándar estimada de la población de una muestra  $s$  entre el valor de la media de dicha muestra  $\bar{x}$ . En lugar de RSD, se utilizará el símbolo  $w$  para la desviación estándar relativa. Así,  $w = s/\bar{x}$ .

Para una distribución de Poisson,  $x$  se calcula mediante la ecuación:

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

Si el valor de  $w$  se establece como el límite de precisión relativa aceptable al 50% (lo que parece ser razonable en microbiología), el límite inferior de determinación será el número de colonias obtenido mediante la fórmula:

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

Por consiguiente, los resultados basados en recuentos inferiores a 4 deberían considerarse como simple detección de la presencia del microorganismo.

En resumen:

Si la placa contiene menos de 10 colonias, pero como mínimo 4, el resultado se calcula siguiendo el caso general (10.3.2.2) y se expresa como número estimado de microorganismos  $x$  por mililitro (productos líquidos) o por gramos (resto de productos).

Si el resultado total oscila entre 1 y 3, la precisión del análisis es demasiado baja y el resultado debe expresarse como:

“Hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a  $(4 \times d)$  por gramo o ml”.

##### 10.3.2.4.2 Caso en el que la placa (muestra para análisis, suspensión inicial o primera dilución) no contiene colonias

Si la placa que contiene la muestra para análisis (productos líquidos) o la suspensión inicial (resto de productos), o la primera dilución inoculada o escogida no contiene colonias, el resultado se expresa de la siguiente manera:

“Menos de  $1/d$  microorganismos por mililitro” (productos líquidos) o “menos de  $1/d$  microorganismos por gramo” (resto de productos).

donde  $d$  es el factor de dilución de la suspensión inicial, o de la primera dilución inoculada o escogida ( $d = 10^0 = 1$  cuando se inocula directamente la muestra para análisis).

#### 10.3.2.4.3 Casos especiales

##### 10.3.2.4.3.1 Generalidades

Estos casos afectan al recuento de colonias típicas o sospechosas.

##### 10.3.2.4.3.2 Caso 1

Si el número de colonias típicas y atípicas de la placa que contiene la primera dilución  $d_1$  es mayor de 300 (o de otra cantidad establecida en la norma específica), con colonias confirmadas o colonias típicas visibles, y si la placa de la siguiente dilución  $d_2$  contiene menos de 300 colonias (u otra cantidad establecida en la norma específica), sin colonias típicas o confirmadas visibles, el resultado se expresa de la siguiente manera:

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

donde  $d_1$  y  $d_2$  son los factores de dilución correspondientes a las diluciones  $d_1$  y  $d_2$ .

EJEMPLO El recuento ha proporcionado los siguientes resultados:

- para la primera dilución escogida ( $10^{-2}$ ): más de 300 colonias en la placa, con colonias típicas o confirmadas;
- para la segunda dilución escogida ( $10^{-3}$ ): 33 colonias, sin colonias típicas o confirmadas;

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

##### 10.3.2.4.3.3 Caso 2

Si el número de colonias típicas y atípicas de la placa que contiene la primera dilución  $d_1$  es mayor de 300 (o de otra cantidad establecida en la norma específica), sin colonias confirmadas o colonias típicas visibles, y si la placa de la siguiente dilución  $d_2$  contiene menos de 300 colonias (u otra cantidad establecida en la norma específica), sin colonias confirmadas o típicas visibles, el resultado se expresa de la siguiente manera:

“menos de  $1/d_2$  microorganismos por mililitro” (productos líquidos) o “menos de  $1/d_2$  microorganismos por gramo” (resto de productos).

donde  $d_2$  es el factor de dilución correspondiente a las dilución  $d_2$ .

EJEMPLO El recuento ha proporcionado los siguientes resultados:

- para la primera dilución escogida ( $10^{-2}$ ): más de 300 colonias en la placa, sin colonias típicas o confirmadas;
- para la segunda dilución escogida ( $10^{-3}$ ): 33 colonias, sin colonias típicas o confirmadas;

El resultado, expresado en número de microorganismos, es inferior a 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 del recuento (colonias totales, colonias típicas o colonias sospechosas) en la placa que contiene la primera dilución  $d_1$  es superior a 300 (o a otra cantidad establecida en la norma específica), mientras que el número de colonias (colonias totales, colonias típicas o colonias que cumplen los criterios de identificación) en la placa que contiene la siguiente dilución  $d_2$  es inferior a 10:

- si el número de colonias de la placa que contiene la dilución  $d_1$  está incluido entre los valores de 300 y 334 (el intervalo superior del intervalo de confianza para una media corregida igual a 300), se utiliza el método de cálculo del caso general (véase el apartado 10.3.2.2);

- si el número de colonias de la placa que contiene la dilución  $d_1$  es mayor de 334 (el límite superior del intervalo de confianza para una media corregida igual a 300), se considera solamente el resultado del recuento de la dilución  $d_2$  y se calcula el recuento estimado (véase el apartado 10.3.2.4), excepto si se ha establecido un valor máximo de 300 para el recuento de colonias, cuando el recuento estimado es inferior a 8 (el límite inferior del intervalo de confianza para una media corregida igual a 10), ya que la diferencia entre las dos diluciones es inaceptable.

Las cifras correspondientes a los intervalos de confianza deben adaptarse a los números máximos establecidos para el recuento de colonias.

EJEMPLO 1 El recuento ha proporcionado los siguientes resultados:

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

Se utiliza el método de cálculo del caso general utilizando las placas de las dos diluciones escogidas.

EJEMPLO 2 El recuento ha proporcionado los siguientes resultados:

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

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

EJEMPLO 3 El recuento (para el que se ha establecido un número máximo de recuento de colonias de 300) ha proporcionado los siguientes resultados:

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

El resultado de este recuento no es aceptable.

EJEMPLO 4 El recuento (para el que se ha establecido un número máximo de recuento de colonias de 150) ha proporcionado los siguientes resultados:

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

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

**10.3.2.5.2** Si el recuento de colonias (colonias totales, colonias típicas y colonias sospechosas) en todas las placas de todas las diluciones inoculadas es mayor de 300 (u otra cantidad establecida en la norma específica), el resultado se expresa de la siguiente manera:

“más de  $300/d$ ” (para el caso de colonias totales o colonias típicas) o “más de  $300 \times b/A \times 1/d$ ” (para colonias confirmadas), expresado en microorganismos por mililitro (productos líquidos) o microorganismos por gramo (resto de productos).

donde

$d$  es el factor de dilución correspondiente a la última dilución inoculada;

$b$  es el número de colonias que cumplen los criterios de identificación dentro de las colonias sospechosas  $A$ .

**10.3.2.5.3** Si la placa correspondiente a la última dilución inoculada contiene más de 10 colonias y menos de 300 colonias (u otra cantidad establecida en la norma específica) (colonias totales, colonias típicas o colonias sospechosas), el número de microorganismos presentes  $N'$  se calcula utilizando 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 de inóculo incluido dentro de cada placa, en mililitros;

$d$  es la dilución correspondiente a la dilución escogida.

El resultado se redondea según se indica en el apartado 10.3.2.2.

El resultado se expresa como número de microorganismos  $N'$  por mililitro (para los productos líquidos) o por gramo (para el resto de productos).

EJEMPLO El recuento ha proporcionado los siguientes resultados:

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

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

Redondeando el resultado como se indicó en el apartado 10.3.2.2, el número de microorganismos  $N'$  es de 1 200 000 o  $1,2 \times 10^6$  por mililitro o por gramo de producto.

### 10.3.2.6 Medida de la incertidumbre

Para las determinaciones cuantitativas, véase la Especificación Técnica ISO/TS 19036.

## 10.4 Recuento de levaduras y mohos

### 10.4.1 Generalidades

El recuento de las levaduras y los mohos debería realizarse normalmente mediante la técnica de siembra en profundidad, que permite un recuento más sencillo o mediante la técnica de siembra en superficie, que proporciona la máxima exposición de las células al oxígeno atmosférico y evita el stress térmico del agar fundido. Las placas previamente vertidas deberían secarse antes de inocularse (véase la Especificación Técnica ISO/TS 11133).

Algunos mohos y levaduras pueden ser infecciosos o inducir respuestas alérgicas, a veces incluso en individuos sanos. Por consiguiente, es importante ser razonablemente cuidadoso cuando se trabaje con ellos. Idealmente, las placas deberían mantenerse en los incubadores, no en una sala abierta. Las tapas de las placas deberían abrirse con la menor frecuencia posible, normalmente sólo con objetivos esenciales, como la realización de preparaciones para el análisis microscópico. Las agujas flameadas deberían enfriarse antes de realizar las transferencias, para evitar la dispersión de conidia y de otras células. Las mesas de trabajo y los incubadores deberían desinfectarse rutinariamente.

Las placas de Petri deberían incubarse rectas y en reposo hasta que estén listas para el recuento, ya que el movimiento puede ocasionar la liberación de conidia o de esporas y el subsiguiente desarrollo de colonias satélites, que ocasionarían una sobreestimación de la población.

### 10.4.2 Recuento de colonias de levaduras y mohos

Se suelen contar placas con un número de colonias de entre 10 y 150. Si la micoflora está compuesta principalmente de mohos, se seleccionan las placas dentro del intervalo de recuentos más bajos; si la micoflora consiste fundamentalmente en levaduras, pueden seleccionarse las placas que contienen hasta el límite superior de recuento.

Si la identidad de las colonias es dudosa, se examinan preparaciones húmedas o teñidas de células procedentes de un mínimo de cinco colonias por muestra para confirmar que no hay bacterias presentes.

## 10.5 Recuento mediante el uso de un medio líquido

### 10.5.1 Principio

Se inoculan las porciones de análisis en un medio líquido diseñado para permitir el crecimiento de un microorganismo o un grupo de microorganismos determinados, y que normalmente inhibe la proliferación de los demás microorganismos.

Pueden utilizarse distintos criterios para determinar si se ha producido crecimiento de los microorganismos estudiados, como por ejemplo la detección visual de la turbidez, la producción de gas, los cambios de color o el posterior aislamiento de los microorganismos en un medio de agar selectivo. La composición del medio de cultivo y los criterios con los que discriminar entre un resultado positivo o negativo se definen en las normas correspondientes.

Mediante esta aproximación sólo se puede asignar un valor cualitativo a cada porción de análisis, es decir, el resultado solamente puede ser positivo o negativo. Para obtener una estimación de la cantidad de microorganismos presentes es necesario examinar varias porciones de análisis y aplicar procedimientos estadísticos para determinar el número más probable (NMP).

## **10.5.2 Inoculación**

### **10.5.2.1 Generalidades**

Si se utiliza un medio de cultivo selectivo, la adición de la porción de análisis no debería reducir sus propiedades selectivas (permitiendo en ese caso el crecimiento de microorganismos no deseados). En la mayoría de las normas se ofrece información sobre la compatibilidad de un medio de cultivo con una matriz concreta dentro del capítulo de "objeto y campo de aplicación", pero se debería prestar atención a matrices como las especias, el cacao, los concentrados de caldo, etc. ya que pueden contener sustancias inhibitoras del crecimiento que requieren la adición de compuestos neutralizantes, el uso de factores de dilución mayores, la centrifugación, la filtración o la separación inmunomagnética para separar a los microorganismos estudiados de la matriz, incluso aunque no se especifique siempre en la norma correspondiente. La incompatibilidad también se puede deber a la composición biológica de la matriz: las muestras ambientales fuertemente contaminadas, los productos fermentados o los productos con bacterias probióticas representan lógicamente un desafío más importante para el microbiólogo analítico que las muestras que contienen solamente unos pocos microorganismos. Para dichas matrices problemáticas, deberían realizarse análisis de adición externa de microorganismos representativos para verificar que el método es realmente compatible con dicha matriz.

### **10.5.2.2 Procedimiento**

Salvo que las normas específicas indiquen lo contrario, los volúmenes de porción de análisis iguales o inferiores a 1 ml se pueden añadir normalmente a volúmenes cinco o diez veces superiores de los medios ya preparados a la concentración de trabajo. Las porciones de análisis de entre 1 ml y 100 ml se pueden añadir normalmente a volúmenes iguales de los medios a concentración doble de la de trabajo.

Para volúmenes superiores a 100 ml, pueden utilizarse medios más concentrados. En casos especiales, los medios estériles deshidratados se pueden disolver en la muestra que se va a analizar refrigerada (o previamente calentada a 30 °C).

Salvo indicación en sentido contrario, el intervalo transcurrido entre la preparación de la primera dilución de la muestra y la inoculación del último tubo, placa multipocillos o botella no debería ser inferior a 15 min.

Debe utilizarse una pipeta estéril nueva para cada dilución.

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

La esencia del método del NMP es diluir la muestra hasta un nivel en el que los inóculos contengan algunas veces, pero no siempre, microorganismos viables. El "resultado", es decir, el número de inóculos para los que se observa crecimiento a cada dilución proporcionará una estimación de la concentración inicial de bacterias en la muestra. Para poder obtener estimaciones a lo largo de un amplio intervalo de posibles concentraciones, los microbiólogos emplean diluciones seriadas, incubando varios tubos (o placas, etc.) para cada dilución. El número más probable (NMP) de microorganismos presentes en la muestra original y la precisión de la estimación pueden calcularse mediante procedimientos estadísticos basados en el número de tubos positivos y negativos presentes tras la incubación.

Se escoge entre las diversas configuraciones posibles de NMP en función de

- el número esperado de microorganismos de la muestra analizada.
- las necesidades normativas,
- la precisión requerida, y
- cualquier otra consideración práctica.

La incertidumbre de la medida depende del número de porciones de análisis positivas encontradas, aproximadamente de la misma manera que la incertidumbre en el recuento de colonias depende del número de colonias de la placa. La incertidumbre de la medida aumenta en proporción inversa a la raíz cuadrada del número de tubos utilizados. El número de tubos se debe cuadruplicar para reducir a la mitad la incertidumbre de la medida. En los sistemas en los que el número de réplicas es reducido, la incertidumbre de la medida es alta.

Dependiendo de su tamaño, las porciones de análisis pueden inocularse en tubos o botellas con la cantidad necesaria de medio líquido. Para las porciones de análisis pequeñas, pueden utilizarse también placas multipocillos.

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

Cuando la concentración esperada de microorganismos es pequeña o se espera que varíe solamente de forma moderada, el sistema de inoculación más adecuado es el de una serie única de porciones de análisis iguales. Si se espera que la proporción aproximada entre el número máximo y el número mínimo de microorganismos va a ser inferior a 25, el número mínimo de porciones de análisis en paralelo con las que se espera que salga bien es de 10; para 50 tubos en paralelo, el límite es una proporción de 200. En las tablas B.1 a B.4 del anexo B se muestran ejemplos de NMPs de diluciones únicas.

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

Cuando no se conoce la concentración esperada de microorganismos en la muestra, o si se espera un alto grado de variación, puede ser necesario inocular varias series de tubos de distintas diluciones. Se inocula un número suficiente de diluciones para asegurar que aparecen tanto resultados positivos como negativos. El número de diluciones también depende del método de cálculo utilizado para la estimación del NMP. Si se necesita hacer uso de tablas, se debe disponer de resultados procedentes de tres diluciones, y la configuración de los sistemas se restringe a los disponibles en las tablas. Si se emplean programas informáticos, no hay restricción en el número de diluciones y de tubos en paralelo utilizados.

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

Los sistemas simétricos de NMP más habituales utilizan entre tres y cinco tubos en paralelo para cada dilución. La precisión conseguida con este sistema se reduce rápidamente cuando disminuye el número de tubos para cada dilución. Los resultados procedentes de un diseño con tres tubos apenas son más que una indicación del orden de magnitud de la concentración. Si se necesita una precisión mayor, se recomienda utilizar cinco o más tubos en paralelo. En las tablas B.5 y B.7 del anexo B se muestran ejemplos de un NMP para tres tubos y de un NMP para cinco tubos, respectivamente.

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

En los sistemas asimétricos, las distintas diluciones no tienen el mismo número de tubos. Estos sistemas se utilizan solamente para estimar el número de microorganismos dentro de un intervalo bien definido. En la Norma ISO 8199 se pueden consultar ejemplos.

#### **10.5.4 Inoculación**

Los tubos, matraces o botellas inoculadas se incuban en un incubador o en un baño de agua. Las placas multipocillos se incuban en un incubador.

Se escoge la temperatura y duración de la incubación en base al método descrito en una norma específica, ya que depende del microorganismo o del grupo de microorganismos estudiados.

Para algunos microorganismos, puede ser necesario un proceso de incubación en dos fases y/o una etapa de confirmación. Consúltense los detalles en las normas específicas.

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

Los criterios que distinguen a los resultados positivos de los negativos varían para cada microorganismo o grupo de microorganismos y se definen en las normas correspondientes. Utilizando estos criterios, se cuenta y se registra el número de resultados positivos obtenidos en cada porción de análisis procedente de cada muestra.

### 10.5.6 Determinación de los valores de NMP

Hay tres posibilidades distintas de determinar el valor de NMP: el cálculo mediante fórmulas matemáticas, la consulta de tablas de NMP o el empleo de programas informáticos específicos. Siempre que se basen en las mismas consideraciones estadísticas, las tres son igualmente válidas. Estos tres métodos se detallan a continuación.

#### 10.5.6.1 Fórmulas matemáticas

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

Los valores aproximados de NMP para cualquier número de diluciones y de tubos en paralelo se obtienen aplicando la siguiente ecuación (adaptada de la referencia [36] de la bibliografía):

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

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 de la muestra en todos los tubos que han presentado reacciones negativas, en gramos;

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

El NMP se expresa por masa de referencia de la muestra, en gramos (generalmente 1 g, en ocasiones 100 g).

##### 10.5.6.1.2 Solución “exacta” para una serie de tubos

El valor de NMP para una serie única de tubos viene dado por la fórmula:

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

donde

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

$m_m$  es la masa de muestra en cada tubo de la serie, en gramos;

$\ln$  es el logaritmo natural;

$n$  es el número de tubos de la serie;

$z_p$  es el número de tubos con reacción positiva.

##### 10.5.6.1.3 Estimación de la precisión en análisis de dilución única

Los límites de confianza al 95% de la estimación del NMP pueden calcularse de forma aproximada mediante 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 del intervalo de confianza al 95 %;

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

$m_m$  es la masa de la muestra en cada tubo de la serie, en gramos;

$\ln$  es el logaritmo natural;

$n$  es el número de tubos de la serie;

$z_n$  es el número de tubos con reacción **negativa**.

El signo más está relacionado 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 al aumentar el número de tubos positivos.

#### 10.5.6.1.4 Estimación de la precisión en análisis de dilución múltiple simétricos

El logaritmo decimal de la incertidumbre estándar para un sistema de NMP de dilución múltiple simétrico puede obtenerse mediante la aproximación de la ecuación de Cochran<sup>[28]</sup>:

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

donde

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

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

$n$  es el número de tubos para cada dilución;

Los límites superior e inferior del intervalo de confianza al 95% pueden aproximarse respectivamente multiplicando y dividiendo la estimación del NMP por el antilogaritmo de  $2 \times SE$ . Este procedimiento tiende a exagerar el límite de confianza superior.

#### 10.5.6.2 Tablas de NMP

##### 10.5.6.2.1 Tablas para sistemas de dilución única

Las tablas B.1 a B.4 (anexo B) muestran los valores de NMP y los intervalos de confianza al 95% por porción de análisis para series de 10, 15, 20 y 25 tubos en paralelo [cada tubo se inocula con la misma (única) dilución].

Para expresar el resultado por masa de referencia de la muestra (o de volumen para las muestras líquidas), se multiplican los valores de NMP y de los límites al 95% por la relación (masa de referencia)/(masa de la porción de análisis). La incertidumbre estándar logarítmica no se multiplica. La masa de referencia en microbiología de los alimentos suele ser de 1 g. La masa de la porción de análisis corresponde a la cantidad de muestra (en gramos) presente en el volumen utilizado para inocular los tubos, es decir, 0,1 g, si se ha utilizado 1 ml de un homogenizado de  $10^{-1}$ .

EJEMPLO (Referencia [30] de la bibliografía)

Se inocularon veinte tubos de medio de concentración doble con alícuotas de 5 ml de una muestra diluida 10 veces (0,1 g/ml). Tras la incubación, 16 de estos tubos mostraron un crecimiento aparente. ¿Cuál es la densidad más probable de bacterias (organismos por gramo) en la muestra? La tabla 3 indica que el número más probable de organismos por tubo es de 1,61, con un límite inferior del intervalo de confianza al 95 % de 0,93 y un límite superior al 95% del 2,27.

Cada tubo recibió una porción de análisis de 5 ml, lo que corresponde a 0,5 g de muestra. Por lo tanto, el número más probable de microorganismos en 1 g de muestra se obtiene así:

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

con un intervalo de confianza al 95% dentro de los siguientes límites:

$$\text{límite inferior al 95\% de confianza} = \frac{0,93}{0,5} \text{ por gramo} = 1,9 \text{ por gramo;}$$

$$\text{límite superior al 95\% de confianza} = \frac{2,77}{0,5} \text{ por gramo} = 5,5 \text{ por gramo.}$$



#### 10.5.6.2.2 Tablas para sistemas de diluciones múltiples: tres diluciones consecutivas

En los sistemas simétricos, es una práctica habitual utilizar tres diluciones sucesivas con tres (tabla B.5) o cinco (tabla B.7) réplicas. Se registra el número de resultados positivos de cada serie de tubos y se determina, a partir de la tabla de NMP correspondiente al sistema de inoculación utilizado, el número más probable de microorganismos presentes en el volumen de referencia de la muestra.

Hay combinaciones de tubos positivos con una probabilidad de aparición mucho mayor que otras. Por ejemplo, es mucho menos probable que aparezca una combinación de resultados positivos de 0, 0, 3 que una combinación de 3, 2, 1. Para cuantificar esta probabilidad, se ha asignado un índice de 0 a 3 a todas las combinaciones posibles de resultados positivos. La categoría 1 corresponde a los resultados de probabilidad más alta, mientras que los resultados de la categoría 3 son raros y no son fáciles de reproducir. Los casos peores son los resultados de la categoría 0; deberían considerarse con un alto grado de desconfianza. Asumiendo que los resultados del análisis son correctos, debería esperarse que el 95% de las combinaciones correspondan a la categoría 1, el 4% a la categoría 2, el 0,9% a la categoría 3 y solamente el 0,1% a la categoría 0. En la tabla B.6 se explican con mayor detalle las categorías.

En el caso en que se realicen más de tres diluciones, la selección de la combinación “correcta” de tres diluciones consecutivas no siempre es muy evidente. Sin embargo, se puede hacer fácilmente registrando todas las combinaciones posibles de tubos positivos, determinando en la tabla B.5 a qué categoría corresponde.

Por consiguiente, se aplican las reglas siguientes:

- 1) Se selecciona la combinación de tres diluciones consecutivas con un perfil de categoría 1 para obtener el índice de NMP. Si se obtiene más de una combinación con perfil de categoría 1, se utiliza la que tenga un mayor número de tubos positivos.
- 2) Si no se encuentra ninguna combinación de categoría 1, se utiliza la que presente un perfil de categoría 2. Si se obtiene más de una combinación con perfil de categoría 2, se utiliza la que tenga un mayor número de tubos positivos.
- 3) Si no se encuentra ninguna combinación de categoría 2, se utiliza la que presente un perfil de categoría 3. Si se obtiene más de una combinación con perfil de categoría 3, se utiliza la que tenga un mayor número de tubos positivos.

En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos.

Tabla 1 – Ejemplos de la selección de resultados positivos para el cálculo del NMP

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

<sup>a</sup> El subrayado indica la combinación escogida.

<sup>b</sup> Calculado mediante el uso del índice de NMP (véase la tabla B.5).

### 10.5.6.3 Programas informáticos

Los programas informáticos más versátiles no plantean restricciones en el número de diluciones ni en la simetría o en los tubos en paralelo del sistema de NMP. El *NMP Assay Analyzer* es un programa de acceso libre basado en un programa previo (véase la referencia [29] de la bibliografía).

### 10.5.7 Expresión de los resultados

Utilizando el índice de NMP determinado en la tabla B.5 [según la combinación de tres (o cinco) diluciones consecutivas escogidas], se determina la cantidad más probable de microorganismos en el volumen de referencia.

El resultado se expresa como el número más probable de microorganismos (o de un grupo específico de microorganismos) por gramo o por mililitro. La masa o el volumen de referencia pueden ser diferentes del g o del ml (por ejemplo 100 g o 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 un microorganismo determinado en una cierta cantidad de producto.

### 11.2 Principio

Salvo que la norma internacional correspondiente indique lo contrario, se mezcla (para productos líquidos) o se homogeneiza (para el resto de productos) una cantidad *P* del producto que se va a analizar con  $9 \times P$  ml o  $9 \times P$  g de un medio selectivo y/o electivo.

Para facilitar la recuperación de microorganismos sometidos a stress en los alimentos, las muestras se suelen pre-enriquecer en un medio no selectivo seguido de aislamiento y enriquecimiento selectivo en un medio de agar diferencial/selectivo. El uso de dos medios de enriquecimiento diferentes, así como de dos o más medios de agar selectivos, aumenta la sensibilidad del método.

Tras la incubación, se utiliza un asa de siembra para extender el cultivo obtenido sobre la superficie de un medio de agar selectivo, de forma que se obtengan colonias aisladas. Salvo indicación en sentido contrario, los medios de enriquecimiento incubados solamente se pueden refrigerar tras la evaluación del impacto de la refrigeración sobre los resultados y solamente cuando se estipula claramente en el informe del análisis.

A continuación un número de colonias obtenidas tras la incubación (generalmente cinco por placa de agar) se identifica utilizando técnicas de confirmación adecuadas.

La selección de colonias para confirmación debería incluir a todos los tipos representativos de colonias sospechosas.

### **11.3 Medida de la incertidumbre**

La estimación de la incertidumbre de medida en las determinaciones cualitativas está siendo investigada por el Subcomité ISO/TC 34/SC 9.

## **12 MÉTODOS DE CONFIRMACIÓN**

### **12.1 Generalidades**

Se utilizan exclusivamente cultivos puros para la confirmación serológica y bioquímica.

Los análisis de confirmación de referencia se describen en las normas específicas. Como alternativa a los análisis bioquímicos descritos en estas normas específicas, los métodos de confirmación descritos en ese capítulo (galerías bioquímicas, sondas de ácidos nucleicos) pueden utilizarse bajo las condiciones descritas en este capítulo, salvo que las normas específicas indiquen lo contrario.

### **12.2 Preparación de un cultivo puro**

La preparación de un cultivo puro comienza por la selección de una colonia única en la superficie o el interior de un medio de agar. A continuación se inocula la colonia seleccionada en un medio de agar no selectivo. Tras la incubación, se selecciona una colonia bien aislada para los posteriores análisis de confirmación. Esta operación se repite en caso necesario.

En la medida de lo posible, los análisis de confirmación deberían realizarse con células procedentes de una colonia única. Si no hay suficiente material celular en una colonia, debería subcultivarse primero en un medio líquido o en un tubo de agar inclinado, tras lo cual puede utilizarse para los análisis que se deban realizar.

### **12.3 Tinción de Gram (técnica de Hucker modificada)**

#### **12.3.1 Generalidades**

Esta forma de tinción de las células bacterianas permite la descripción de la morfología de las bacterias y su clasificación en dos grupos, según sean capaces o no de retener el cristal violeta (Gram +) en las condiciones de análisis. Esta división refleja diferencias en la estructura de las paredes celulares entre los dos grupos, y se correlaciona con otras diferencias importantes entre los dos grupos.

Una buena alternativa para la tinción de Gram es el uso de una disolución de hidróxido potásico (KOH) al 3%. Un asa de siembra cargada con cultivo bacteriano se agita con dos gotas de disolución de KOH. Las bacterias Gram-negativas hacen que la disolución se vuelva muy viscosa y mucosa en un tiempo de 30 s, de forma que al levantar el asa, se arrastra una parte de la mezcla en forma de hebra.

Hay diversas formas de realizar una tinción de Gram, pero todas siguen los pasos que se indican a continuación.

#### **12.3.2 Disoluciones**

##### **12.3.2.1 Generalidades**

Pueden utilizarse disoluciones comerciales disponibles en el mercado.

En este caso, se siguen las indicaciones del fabricante.

### 12.3.2.2 Disolución de cristal violeta

#### 12.3.2.2.1 Composición

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

#### 12.3.2.2.2 Preparación

Se disuelve el cristal violeta en el etanol, y el oxalato amónico en el agua destilada. Se mezclan las dos disoluciones y se deja la mezcla en reposo durante 24 h antes de utilizarse.

### 12.3.2.3 Disolución de iodo

#### 12.3.2.3.1 Composición

Iodo	1,0 g
Ioduro potásico (KI)	2,0 g
Agua	100 ml

#### 12.3.2.3.2 Preparación

Se disuelve el ioduro potásico en 10 ml de agua y se añade el iodo en pequeñas fracciones. Tras disolver, se enrasa hasta un volumen de 100 ml en un matraz aforado.

### 12.3.2.4 Disolución 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

Se disuelve la safranina en el etanol y a continuación se mezcla con el agua destilada.

### 12.3.3 Técnica de tinción

En un portaobjetos de microscopía se fija a la llama una película de bacterias, preparadas a partir de un cultivo de 18 h o 24 h o cuando el medio haya alcanzado la turbidez. Se cubre esta película con cristal violeta y se deja reaccionar durante 1 min.

Se aclara cuidadosamente el portaobjetos inclinado con agua durante unos segundos.

Se cubre el portaobjetos con la disolución de iodo. Se deja reaccionar durante 1 min.

Se aclara cuidadosamente el portaobjetos inclinado con agua durante unos segundos.

Se vierte de forma cuidadosa pero constante una película de etanol (95%) sobre el portaobjetos inclinado durante un período no superior a 30 s hasta que no se elimine más color violeta.

Se aclara cuidadosamente el portaobjetos inclinado con agua para eliminar el etanol. Se cubre el portaobjetos con la disolución de safranina durante 10 s. Se enjuaga cuidadosamente el portaobjetos inclinado con agua.

Se seca el portaobjetos.

#### 12.3.4 Interpretación

Se examina el portaobjetos con un objetivo de alto número de aumentos de inmersión en aceite. Las células bacterianas que aparecen azules o violetas se denominan Gram-positivas (Gram +); las que muestran un color entre rosa oscuro y rojo se denominan Gram-negativas (Gram -).

En un cultivo puro de algunos tipos de bacterias pueden obtenerse tanto células Gram-positivas como Gram-negativas dentro del mismo campo microscópico.

NOTA Una densidad celular muy elevada puede mostrar una respuesta poco característica.

#### 12.4 Uso de galerías bioquímicas para la identificación

Pueden utilizarse las galerías bioquímicas disponibles para la identificación de colonias aisladas.

Se debe verificar que las galerías son adecuadas, según estudios de evaluación publicados en la literatura científica internacional, preferiblemente relacionada con la microbiología de los alimentos<sup>4)</sup>. Esta verificación es especialmente importante si el fabricante no posee datos de validación para dichas galerías.

El laboratorio debería obtener un certificado de control para cada lote, con una indicación de las cepas de análisis.

El fabricante también debe especificar las cepas de control que puede utilizar el laboratorio para verificar que las colecciones mantienen un correcto funcionamiento.

Como mínimo, las galerías deben incluir los análisis bioquímicos descritos en las normas específicas, o suplementarse con otros análisis.

#### 12.5 Uso de sondas de ácidos nucleicos para la identificación

Pueden utilizarse las sondas de ácidos nucleicos disponibles actualmente para la identificación de colonias aisladas.

No obstante, se debe verificar que las sondas de ácidos nucleicos utilizadas para la confirmación son adecuadas, según estudios de evaluación publicados en la literatura científica internacional, preferiblemente relacionada con la microbiología de los alimentos (consúltese por ejemplo la referencia [23] de la bibliografía). Esta verificación es especialmente importante si el fabricante no posee datos de validación para dichas sondas.

El laboratorio debería obtener un certificado de control para cada lote, con una indicación de las cepas de análisis.

El fabricante también debe especificar las cepas de control que puede utilizar el laboratorio para verificar que las sondas mantienen un correcto funcionamiento.

#### 12.6 Métodos serológicos

##### 12.6.1 Generalidades

Cuando se necesite una confirmación serológica, ésta se realiza después de la identificación bioquímica de las colonias aisladas.

##### 12.6.2 Análisis de aglutinación en portaobjetos

Las reacciones antígeno-anticuerpo causan agregación de las células bacterianas y la formación de masas floculentas o gránulos densos. En las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, la reacción entre el antígeno "H" (es decir, flagelar) y su antisuero específico ocasiona una agregación floculenta, mientras que la reacción del antígeno "O" (es decir, somático) ocasiona una agregación granular más densa.

---

4) Las solicitudes de información deberían dirigirse a los centros de referencia nacionales, regionales o internacionales indicados para cada microorganismo.

Previamente a la aglutinación con los antisuecos, debería realizarse un análisis para determinar si las células bacterianas se aglutinan en una disolución de cloruro sódico [al 3 % (en masa)]. Si las células bacterianas se aglutinan, la cepa es autoaglutinante y no debería utilizarse para análisis de aglutinación con antisuecos.

Los antisuecos comerciales disponibles en el mercado son de dos tipos: antisuecos polivalentes que reaccionan con microorganismos de un género determinado o con grupos de serotipos, que son útiles para los análisis preliminares, y anticuerpos monoclonales, que permiten identificar un serotipo concreto.

El laboratorio debería obtener un certificado de control para cada lote de antisuecos, con una indicación de las cepas de análisis.

Se comprueba que los análisis de aglutinación en portaobjetos son adecuados, según estudios de evaluación publicados en la literatura científica internacional, preferiblemente relacionada con la microbiología de los alimentos<sup>5)</sup>.

Cuando se utilizan estos reactivos, deberían realizarse controles positivos y negativos adecuados.

### 12.6.3 Análisis de aglutinación en látex

Existe un método comercial disponible en el mercado más rápido, que emplea partículas de látex recubiertas de anticuerpos específicos de grupo (por ejemplo, consúltase la Norma ISO 16654 para *Escherichia coli* O157, o la Norma ISO 6888 para *Staphylococcus aureus*). El antígeno del extracto se ensaya frente a una batería de reactivos de látex.

Se comprueba que los análisis de aglutinación en látex son adecuados, según estudios de evaluación publicados en la literatura científica internacional, preferiblemente relacionada con la microbiología de los alimentos<sup>5)</sup>.

El laboratorio debería obtener un certificado de control para cada lote, con una indicación de las cepas de análisis.

Cuando se utilizan estos reactivos, deberían realizarse controles positivos y negativos adecuados.

## 13 INFORME DEL ANÁLISIS

El informe del análisis debe especificar el método de análisis utilizado, la temperatura de incubación, en caso necesario, y los resultados obtenidos. También debe mencionar todos los detalles experimentales no descritos en esta norma internacional, así como los considerados opcionales, junto con todo tipo de detalles o incidencias que pudieran haber influido sobre los resultados.

En el informe del análisis también se indica si se van a realizar análisis adicionales en un laboratorio de referencia o, en el caso de que dichos análisis ya se hayan realizado, cuáles han sido los resultados.

El informe del análisis debe incluir toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra. También es adecuado incluir toda la información necesaria para la interpretación de los resultados del análisis.

En caso necesario, debería incluirse en el informe del análisis la medida de la incertidumbre, determinada de acuerdo con la Especificación Técnica ISO/TS 19036.

## 14 VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

### 14.1 Validación de los métodos de referencia

La validación de los métodos de referencia se está investigando en el Subcomité ISO/TC 34/SC 9.

### 14.2 Validación de los métodos alternativos

Consúltase la Norma ISO 16140 sobre los procedimientos técnicos para la validación de los métodos alternativos respecto a los métodos de referencia.

---

5) Las solicitudes de información deberían dirigirse a los centros de referencia nacionales, regionales o internacionales indicados para cada microorganismo.

### **14.3 Validación de los métodos internos**

La validación de los métodos internos se está investigando en el Subcomité ISO/TC 34/SC 9.

## **15 VALORACIÓN DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS/CONTROL DE CALIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DEL MÉTODO**

### **15.1 Control interno de la calidad**

**15.1.1** El control interno de la calidad consiste en todos los procedimientos realizados por un laboratorio para la evaluación continua de su trabajo. El objetivo fundamental es asegurar la consistencia de los resultados día tras día y su conformidad en base a criterios bien definidos.

**15.1.2** Es necesario mantener un programa de comprobaciones periódicas para demostrar que la variabilidad (entre analistas, entre equipos o entre materiales) está controlada. Se deben abarcar todos los análisis incluidos dentro del ámbito de actividades del laboratorio.

El programa puede incluir:

- el uso de muestras a las que se ha añadido externamente unos niveles de contaminación variables, incluyendo tanto la flora basal como la que está siendo sometida a investigación;
- el uso de muestras contaminadas artificialmente o de forma natural procedentes de diversas matrices;
- el uso de materiales de referencia (incluyendo materiales incluidos en esquemas de capacitación analítica);
- repetición de los análisis;
- repetición de la evaluación de los resultados de los análisis.

La periodicidad entre dichas comprobaciones está relacionada con la naturaleza de los análisis realizados por el laboratorio y con la frecuencia con la que se realizan los análisis.

Se recomienda que, en la medida de lo posible, los análisis incorporen controles con los que monitorizar su correcto funcionamiento.

**15.1.3** En casos especiales, un laboratorio puede realizar un análisis determinado sólo de forma muy ocasional. En estos casos, se acepta que un programa de control interno de la calidad puede no resultar adecuado y que, por el contrario, es más razonable un control realizado en paralelo a los análisis que demuestre su correcto funcionamiento.

### **15.2 Cepas de referencia**

Véase la Norma ISO 11133 sobre el mantenimiento de las cepas de referencia.

### **15.3 Valoración externa de la calidad (ejercicios interlaboratorios)**

Los laboratorios deberían participar periódicamente en ejercicios interlaboratorios relacionados con su ámbito de actividades. Deberían priorizarse los ejercicios interlaboratorios sobre las matrices adecuadas.

Los laboratorios deberían utilizar los ejercicios interlaboratorios, no solamente para evaluar las posibles tendencias del laboratorio sino también para comprobar la validez de su sistema de calidad global.

ANEXO A (Informativo)

PROPIEDADES DE ALGUNOS DESINFECTANTES

Tabla A.1 – Propiedades de algunos desinfectantes

Desinfectantes	Activo contra						Inactivado por					Toxicidad			
	Hongos	Bacterias		Micobac- terias	Esporas	Virus lipídicos	Virus no lipídicos	Proteínas	Materiales naturales	Materiales sintéticos	Agua dura	Detergente	Piel	Ojos	Pulmones
		Gram- positivas	Gram- negativas												
Hipocloritos	+	+++	+++	++	++	+	+	+++	+	+	+	C	+	+	+
Alcoholes	-	+++	+++	+++	-	+	V	+	+	+	+	-		+	
Formaldehído	+++	+++	+++	+++	+++ <sup>a</sup>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Glutaraldehído	+++	+++	+++	+++	+++ <sup>b</sup>	+	+	NA	+	+	+	NA	+++	+++	+++
Iodóforos	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+++	+	+	+	A	+	+	-

+++ bueno;  
 ++ intermedio;  
 + débil;  
 - nulo;  
 V depende de los virus;  
 C catiónico;  
 A aniónico;  
 NA no aplicable;

<sup>a</sup> Por encima de 40 °C.  
<sup>b</sup> Por encima de 20 °C.

Fuente: Referencia [17] de la bibliografía.



## ANEXO B (Normativo)

## DETERMINACIÓN DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)

**Tabla B.1 – Valores de NMP por porción de análisis y límites del intervalo de confianza al 95% en una serie de 10 tubos, calculados conforme a la referencia [29] de la bibliografía**

Número de tubos positivos	Series de 10 tubos			
	NMP	Incertidumbre estándar del $\log_{10}$ NMP	Límites al 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 análisis y límites del intervalo de confianza al 95% en una serie de 15 tubos, calculados conforme a la referencia [29] de la bibliografía**

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

**Tabla B.3 – Valores de NMP por porción de análisis y límites del intervalo de confianza al 95% en una serie de 20 tubos, calculados conforme a la referencia [29] de la bibliografía**

Número de tubos positivos	Series de 20 tubos			
	NMP	Incertidumbre estándar del $\log_{10}$ NMP	Límites al 95%	
			Inferior	Superior
1	0,05	0,434	0,01	0,36
2	0,11	0,307	0,03	0,42
3	0,16	0,251	0,05	0,50
4	0,22	0,218	0,08	0,60
5	0,29	0,195	0,12	0,69
6	0,36	0,178	0,16	0,80
7	0,43	0,165	0,20	0,91
8	0,51	0,155	0,25	1,03
9	0,59	0,147	0,31	1,16
10	0,69	0,140	0,37	1,30
11	0,80	0,134	0,44	1,46
12	0,92	0,130	0,51	1,65
13	1,05	0,126	0,59	1,85
14	1,20	0,123	0,69	2,10
15	1,39	0,121	0,80	2,40
16	1,61	0,121	0,93	2,77
17	1,90	0,122	1,09	3,29
18	2,30	0,127	1,30	4,08
19	3,00	0,141	1,58	5,67

**Tabla B.4 – Valores de NMP por porción de análisis y límites del intervalo de confianza al 95% en una serie de 25 tubos, calculados conforme a la referencia [29] de la bibliografía**

Número de tubos positivos	Series de 25 tubos			
	NMP	Incertidumbre estándar del $\log_{10}$ NMP	Límites al 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 del intervalo de confianza (95%) cuando se utilizan tres porciones de análisis de 1 g (ml), tres de 0,1 g (ml) y tres de 0,01 g (ml)**

Número de resultados positivos			Índice de NMP <sup>a</sup>	Categorías <sup>b</sup>	Límites del intervalo de confianza (95%) <sup>a, c</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
0	0	0	<0,30		0,00	0,94
0	0	1	0,30	3	0,01	0,95
0	1	0	0,30	2	0,01	1
0	1	1	0,61	0	0,12	1,7
0	2	0	0,62	3	0,12	1,7
0	3	0	0,94	0	0,35	3,5
1	0	0	0,36	1	0,02	1,7
1	0	1	0,72	2	0,12	1,7
1	0	2	1,1	0	0,4	3,5
1	1	0	0,74	1	0,13	2
1	1	1	1,1	3	0,4	3,5
1	2	0	1,1	2	0,4	3,5
1	2	1	1,5	3	0,5	3,8
1	3	0	1,6	3	0,5	3,8
2	0	0	0,92	1	0,15	3,5
2	0	1	1,4	2	0,4	3,5
2	0	2	2,0	0	0,5	3,8
2	1	0	1,5	1	0,4	3,8
2	1	1	2,0	2	0,5	3,8
2	1	2	2,7	0	0,9	9,4
2	2	0	2,1	1	0,5	4
2	2	1	2,8	3	0,9	9,4
2	2	2	3,5	0	0,9	9,4
2	3	0	2,9	3	0,9	9,4
2	3	1	3,6	0	0,9	9,4
3	0	0	2,3	1	0,5	9,4
3	0	1	3,8	1	0,9	10,4
3	0	2	6,4	3	1,6	18,1
3	1	0	4,3	1	0,9	18,1
3	1	1	7,5	1	1,7	19,9
3	1	2	12	3	3	36
3	1	3	16	0	3	38
3	2	0	9,3	1	1,8	36
3	2	1	15	1	3	38
3	2	2	21	2	3	40
3	2	3	29	3	9	99
3	3	0	24	1	4	99
3	3	1	46	1	9	198
3	3	2	110	1	20	400
3	3	3	>110			

<sup>a</sup> Fuente: Referencia [27] de la bibliografía.

<sup>b</sup> Véase la tabla B.6.

<sup>c</sup> Los límites de confianza mostrados en esta tabla se ofrecen solamente para proporcionar una indicación de la influencia de las variaciones estadísticas sobre los resultados. Siempre van a existir otras fuentes de variación, que en ocasiones pueden ser incluso más importantes.

Tabla B.6 – Explicación sobre las categorías de los resultados

Categoría <sup>a</sup>	Definición
1	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen la mayor probabilidad de obtenerse. Como mucho, hay un 5% de probabilidad de obtener un resultado que es menos probable que el de menor probabilidad de esta categoría.
2	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen una probabilidad de obtenerse menor que incluso el resultado menos probable de la categoría 1, pero hay en el mejor de los casos solamente un 1% de probabilidad de obtener un resultado que es menos probable que el de menor probabilidad de esta categoría.
3	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen una probabilidad de obtenerse menor que incluso el resultado menos probable de la categoría 2, pero hay en el mejor de los casos solamente un 0,1% de probabilidad de obtener un resultado que es menos probable que el de menor probabilidad de esta categoría.
0	Cuando el número de bacterias de la muestra es igual al valor de NMP hallado, este resultado es de los que tienen una probabilidad de obtenerse menor que incluso el resultado menos probable de la categoría 3. Solamente hay un 0,1% de probabilidad de obtener un resultado de esta categoría, incluso sin que se haya cometido ninguna incorrección.

<sup>a</sup> Antes de comenzar los análisis, debería decidirse qué categoría se va a aceptar, es decir, solamente la categoría 1, la 1 y la 2 o incluso la 1, la 2 y la 3. Cuando se vaya a tomar una decisión de gran importancia en base a los resultados, solamente debería aceptarse la categoría 1, o en todo caso la 1 y la 2. Los resultados de la categoría 0 deberían considerarse con un alto grado de desconfianza.

**Tabla B.7 – Valores de NMP por gramo de muestra y límites del intervalo de confianza al 95%  
(cuando se utilizan cinco porciones de análisis de 1 g, cinco de 0,1 g y cinco de 0,01 g)**

Número de tubos que muestran una reacción positiva			NMP (por g)	Límites al 95% de confianza	
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

Número de tubos que muestran una reacción positiva			NMP (por g)	Límites al 95% de confianza	
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	–	–

**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] BELL, C., NEAVES, P. y WILLIAMS, A. P. *Food microbiology and laboratory practice*, Blackwell Science Ltd., Oxford, Reino Unido (2005).
- [2] ISO 9001, *Sistemas de gestión de la calidad. Requisitos*.
- [3] *EA-Guidelines for the use of computer and computer systems in accredited laboratories*. Cooperación europea para la Acreditación (1998).
- [4] EA-4/10, *Accreditation for microbiological laboratories*. Cooperación europea para la Acreditación (2002).
- [5] *Food microbiology program requirements*, basados en el documento FLAWG *United States accreditation criteria for laboratories performing food microbiological testing*, Asociación Americana de Acreditación de Laboratorios (A2LA) (1998).
- [6] AS 1766 *Métodos normalizados australianos para el análisis microbiológico de los alimentos. Parte 1: Técnicas generales y actualización de los procedimientos*.
- [7] BUTTIAUX, R., BEERENS, H. y TACQUET, A. *Manuel de techniques bactériologiques*. Éditions Médicales Flammarion (4ª edición).
- [8] Comité Técnico APHA sobre Métodos Microbiológicos para Alimentos. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 2ª edición, Speck, M. L., editor. Intersociety/Agency Committee on Microbiological Methods for Foods, Asociación de Salud Pública Americana, Washington DC, 1984.
- [9] CRUICKSHANK *et al.* *Medical microbiology*, Vol 2, 12ª edición, Churchill-Livingston, Edimburgo (1975).
- [10] D'AOUST, J. Y. *Psychotrophy and foodborne Salmonella*. Int. J. Food Microbiol. 1991, **13**, pp. 207-16.
- [11] D'AOUST, J. Y., SEWELL, A. M. y MCDONALD, C. *Recovery of Salmonella spp. from refrigerated pre-enrichment cultures of dry food composites*. J. AOAC. Int. 1995, **78**, pp. 1322-7.
- [12] D'AOUST, J. Y., SEWELL, A. M. y 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. y 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. y GRAVESEN, J. *Opbevaring af badevands-og drikkevandsprover ved 0-5 °C et dogt medfører en signifikant reduktion i antal Escherichia coli og kimtal*, Dansk. Vet. 2002, **17**, pp. 1-9.
- [15] HARREWIJN, G. A. y HARTOG, B.J. *Guidelines to perform microbiological analysis of food and food products ("Good laboratory practice")*, De Ware(n)-Chemicus 1979, **9**, pp. 1-11.
- [16] MUIR, G. D., ed. *Hazard in the chemical laboratory*. Real Instituto de Química, Londres (1971).
- [17] *Laboratory biosafety manual*, OMS, Ginebra, 1993.
- [18] LIGHTFOOT, N. F., MAIER, E. A. (eds.) *Microbiological analysis of food and water. Guidelines for quality assurance*. Elsevier, Amsterdam, Países Bajos (1998).
- [19] HARRIGAN, W. F. y MCCANCE, M. E. *Laboratory methods in food and dairy microbiology*, Academic Press (1976).



- [20] *Laboratory safety at the Centres for Disease Control (CDC)*, Publicación NHEW nº CDC 79-8118, Atlanta, 1979.
- [21] *Laboratory safety at the Centres for Disease Control (CDC)*, Dept. de Salud, Educación y Bienestar de EEUU (Servicio de Salud Pública), Atlanta, 1979.
- [22] GERHARDT, P., MURRAY, R. G. E., COSTILLOW, R. N., NESTER, E. W., KRIEG, N. R. y PHILLIPS, G. B., eds. *Manual of methods for general bacteriology*. Sociedad Americana de Microbiology, Washington DC 20006 (1981).
- [23] GNANOU BESSE, N., AUDINET, N., BEAUFORT, A., COLIN, P., CORNIU, M. y LOMBARD, B. *A contribution to the improvement of Leisteria monocytogenes enumeration in cold-smoked salmon*. Int. J. Food Microbiol, 2004, **91**, pp. 119-27.
- [24] *Microbiological testing laboratory accommodation guidelines*, Asociación Nacional de Autoridades de Ensayo, Australia.
- [25] *Microorganisms in foods – I: Their significance and methods os enumeration*, ICMSF, University of Toronto Press (actualización de 1968).
- [26] SHAPTON, D. A., BOARD, R. G. y HAUSTER, W. J. eds. *Safety in microbiology*, Series Técnicas nº 1 y nº 6 de la Sociedad de Bacteriología Aplicada, Academic Press (1972).
- [27] DE MAN, J. C., *NMP Tables* (corregido). 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. y ROSCOE, M. E. *Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series*. J. Appl. Bacteriol., 1983, **55**, pp. 159-64.
- [30] NIEMELA, S. *Statistic evaluation of results from quantitative microbiological examinations*. Comité Nórdico de Análisis de los Alimentos (NMKL) Informe nº 1, 2ª edición (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. y WILLIAMS, S. T. *Bergey’s manual of determinative bacteriology*, 9ª edición, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, EEUU (1984).
- [33] KRIEG, N. R., y HOLT, J. G. *Bergey’s manual of systematic bacteriology*, Volumen 1, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, EEUU (1984).
- [34] SNEATH, P. H. A., MAIR, N. S., SHARPE, M. E. y HOLT, J. G., *Bergey’s manual of systematic bacteriology*, Volumen 2, 2ª edición, Springer, Nueva York, NY, 2001.
- [35] KREGER-VAN RIJ, N. J. W. *The yeasts. A taxonomic study*, 3ª edición, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Países Bajos.
- [36] THOMAS, H. A. *Bacterial densities from fermentation tube tests*. J. Am. Water Works Assoc. 1942, **34**, pp. 572-6.
- [37] Guía ISO/IEC 43-1 *Capacitación analítica mediante comparaciones interlaboratorios. Parte 1: Desarrollo y operación de los esquemas de capacitación analítica*.
- [38] ISO 6888 (todas sus partes) *Microbiología de los alimentos y de los productos alimenticios para animales. Método horizontal para el recuento de estafilococos positivos para coagulasa (Staphylococcus aureus y otras especies)*.

- [39] ISO 9998 *Calidad del agua. Prácticas para la evaluación y el control de los medios microbiológicos de recuento de colonias utilizados en los ensayos de calidad del agua.*
- [40] ISO/TR 13843 *Calidad del agua. Guía sobre la validación de los métodos microbiológicos.*
- [41] ISO 14461-1 *Leche y productos lácteos. Control de la calidad en los laboratorios de microbiología. Parte 1: Evaluación de la capacidad del analista en el recuento de colonias.*
- [42] ISO 14461-2 *Leche y productos lácteos. Control de la calidad en los laboratorios de microbiología. Parte 2: Determinación de la fiabilidad del recuento de colonias en placas en paralelo y en las etapas posteriores de dilución.*
- [43] ISO 16654 *Microbiología de los alimentos y de los productos alimenticios para animales. Método horizontal para la detección de Escherichia coli O 157.*
- [44] ISO/IEC 17025:2005 *Requisitos generales sobre la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.*
- [45] EN 12469 *Biocnología. Criterios de funcionamiento de las cabinas de seguridad microbiológicas.*
- [46] ISO 17604 *Microbiología de los alimentos y de los productos alimenticios para animales. Toma de muestras de cadáveres para el análisis microbiológico.*
- [47] ISO 18593 *Microbiología de los alimentos y de los productos alimenticios para animales. Método horizontal para la técnica de toma de muestras de superficies mediante el uso de placas de contacto y materiales absorbentes.*
- [48] Guía ISO 99:1996 *Vocabulario internacional de términos básicos y generales de metrología.*
- [49] ISO/TC 34/SC 9 N852 *Documento de apoyo sobre el cambio de dos a uno en el número de placas por dilución para las técnicas de recuento de colonias* (revisión de ISO 7218), Junio 2007, Marie Cornu.



---

---

# AENOR

Asociación Española de  
Normalización y Certificación

Dirección C Génova, 6  
28004 MADRID-España

Teléfono 91 432 60 00

Fax 91 310 40 32