

**NORMA
VENEZOLANA**

**COVENIN
1126-89**

**ALIMENTOS.
IDENTIFICACION Y PREPARACION
DE MUESTRAS PARA EL ANALISIS
MICROBIOLOGICO.**

(1^{ra.} REVISION)



PROLOGO

La presente norma sustituye totalmente a la Norma Venezolana COVENIN 1126-77 Alimentos. Codificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico.

TRAMITE

COMITE: CT10 PRODUCTOS ALIMENTICIOS
PRESIDENTE: DRA. FANNY CARRILLO DE PADILLA
SECRETARIA: LIC. GISELA PADRON
SUBCOMITE: CT10/SC3: MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS
COORDINADORA: LIC. GISELA PADRON

PARTICIPANTES

ENTIDAD

MINISTERIO DE SANIDAD Y ASISTENCIA SOCIAL

INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE

INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICION

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD SIMON BOLIVAR

FUNDACION CIEPE

ASOCIACION AMERICANA DE SOYA

BRDLAB S.R.L.

INDULAC

DISCUSION PUBLICA

FECHA DE ENVIO: 25-08-88

DURACION: 45 DIAS

FECHA DE APROBACION POR EL COMITE: 20-03-89

FECHA DE APROBACION POR LA COVENIN: 07-06-89

REPRESENTANTES

VICMAR DE PERNIA

MILAGROS POLANCO
MARIA LUISA NOVDA
MANUELA DE SELGRAD
BETSI BASTARDO

ROSARIO GARRIDO

FANNY CARRILLO DE PADILLA
CARMEN ELENA GARCIA

SILVIA MENDOZA

EUMELIA GOMEZ

JOSE FELIX CHAVEZ

OLGAMAR FRANCESCHI

ZULIA GRAFF
MIROSLAVA MORLES

NORMA VENEZOLANA
ALIMENTOS
IDENTIFICACION Y PREPARACION DE
MUESTRAS PARA EL ANALISIS
MICROBIOLOGICO

COVENIN
1126-89
1ra. REVISION

1 NORMAS COVENIN A CONSULTAR

Esta norma es completa.

2 OBJETO Y CAMPO DE APLICACION

Esta Norma Venezolana contempla el procedimiento a seguir para la identificación y preparación aseptica de las muestras destinadas al análisis microbiológico a fin de asegurar la obtención de resultados valederos, confiables y reproducibles y proteger tanto a las muestras como al personal de laboratorio de posibles contaminaciones.

3 EQUIPO E INSTRUMENTOS

- 3.1 Licuadora de dos velocidades o velocidad simple con control reostático, que opere a una velocidad no menor de 8.000 r.p.m. y no mayor de 45.000 r.p.m.
- 3.2 Homogeneizador mecánico (STOMACHER), que opere a 230 r.p.m., con una capacidad de 400 ml.
- 3.3 Jarra metálica o de vidrio, de 250 ml a 1000 ml de capacidad, provista de tapa; debidamente esterilizadas.
- 3.4 Bolsas de polietileno de paredes delgadas y fondo sellado de 18 cm X 30 cm X 250 B; debidamente esterilizadas.
- 3.5 Balanza de 2.000 g de capacidad y una apreciación de 0,1 g.
- 3.6 Envases apropiados estériles, para contener las muestras.
- 3.7 Frascos con capacidad para contener 90,99 y 450 ml de diluyente.
- 3.8 Instrumentos para preparar las muestras: cuchillos, espátulas, tenedores, pinzas, tijeras, cucharas y otros, debidamente esterilizados.
- 3.9 Pipetas graduadas estériles, de 1, 2, 5, 10 y 11 ml.
- 3.10 Tubos de ensayo estériles de 16 mm X 160 mm, 18 mm X 180 mm, 20 mm X 200 mm u otros apropiados.

- 3.11 Autoclave, horizontal o vertical.
- 3.12 Horno de aire caliente de temperatura regulable (entre 160 - 180 °C)
- 3.13 Refrigerador.
- 3.14 Baño de agua.
- 3.15 Termómetro.

4 MEDIOS DE CULTIVO

- 4.1 DILUENTES (Véase anexo 1)
 - 4.1.1 Solución tampón fosfato a pH 7,2 (Solución de Butterfield).
 - 4.1.2 Agua peptonada al 0,1%.

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

5 MATERIAL A ENSAYAR

El material a ensayar consiste en una muestra representativa del alimento (Ver bibliografía inciso d).

6 PROCEDIMIENTO

6.1 IDENTIFICACION DE LA MUESTRA

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

6.1.1.1 Condiciones en que se recibió la muestra, tales como:

- a) Temperatura (en caso de que la muestra requiera refrigeración o congelación).
- b) Aspecto externo del envase (si está roto, destapado, cierre no hermetico, si presenta oxidación, bombaje, abolladuras, etc.).
- c) Aspecto externo del producto, en caso de que este pueda ser observado.

6.1.1.2 La muestra deberá estar acompañada de la siguiente información:

- a) Fecha de toma de la muestra
- b) Nombre y tipo de producto

- c) Marca comercial.
- d) Fabricante y/o distribuidor.
- e) Número del lote de fabricación.
- f) Contenido neto del envase.
- g) Ingredientes.
- h) Fecha de fabricación y/o vencimiento.
- i) Cualquier otra información que sirva de orientación para el análisis microbiológico, ejemplo: diagrama de flujo del proceso u otra.

6.1.2 Conservación de la muestra previo a su análisis.

6.1.2.1 Las muestras deberán ser analizadas lo mas pronto posible una vez recibidas en el laboratorio,

6.1.2.2 Si el análisis debe ser postergado se almacenan las muestras congeladas a -20°C . Las muestras refrigeradas se deben almacenar entre $0 - 4,4^{\circ}\text{C}$ por no mas de 36 horas.

6.1.2.3 En el caso de muestras no perecedoras, estas deberán almacenarse a temperatura ambiente en un lugar seco y fresco.

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

6.2 PREPARACION DE LA MUESTRA

6.2.1 Condiciones generales

6.2.1.1 El sitio donde se realizará el análisis microbiológico deberá reunir las condiciones de asepsia indispensables. El material y equipo a utilizar deben estar convenientemente preparados, identificados y listos para su uso.

6.2.1.2 Cuando se abra el recipiente con la muestra debe evitarse cualquier tipo de contaminación.

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

6.2.1.3 Las latas, jarras y otros recipientes cerrados deberán lavarse y secarse; desinfectar el área de preparación de la muestra mediante algún agente adecuado tal como el alcohol de 70° , el cual se elimina a la llama (flameado). No se deben flamear aquellos envases o empaques que puedan dañarse y/o explotar.

NOTA: En caso de que se requieran condiciones de asepsia más estrictas (prueba del deterioro microbiológico) deben utilizarse además otros desinfectantes, tales como el alcohol yodado (2 % de yodo) y compuestos derivados de amonio cuaternario.

Deben utilizarse cabinas especiales (flujo laminar). Si no se dispone de estas, deberán utilizarse áreas desinfectadas y protegidas de las corrientes de aire.

6.2.1.4 Cuando el producto esté envuelto en cartón, papel celofán, papel aluminio y cualquier otro material de empaque similar, este deberá limpiarse con una tela o esponja humedecida con un agente desinfectante (alcohol de 70°) para eliminar la contaminación superficial y el polvo. Debe darse una atención especial al área de abertura del empaque o envase.

6.2.1.5 Debe tomarse una muestra representativa del alimento.

6.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA SEGUN SU ESTADO FISICO

6.3.1 Si se trata de alimentos líquidos o material que fluya libremente, envasados en recipientes pequeños, debe agitarse por 25 veces haciendo un ángulo de 45° con el brazo o por rotación del recipiente hasta que el contenido sea homogéneo. En el caso de que los recipientes sean grandes y de difícil manejo se deben tomar muestras representativas y trasvasarlas asepticamente a envases estériles más pequeños.

6.3.2 Si la muestra está congelada, se deja descongelar en su recipiente original (o en el cual se recibió en el laboratorio) por un periodo de 15 minutos a 45°C en baño de agua mezclando continuamente o 18 horas entre 2 y 5°C. Si la muestra congelada puede trabajarse fácilmente (ej. un helado) se procede sin descongelar.

6.3.3 Si el material es sólido deben tomarse porciones de diferentes sitios del producto para tener una muestra representativa.

6.3.4 Cuando se tenga un material de difícil manejo debe colocarse en un recipiente grande y estéril, romperse en pequeños trozos usando métodos adecuados bajo condiciones asepticas y de allí se toma una muestra, la cual se transfiere a un recipiente estéril.

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

NOTA: En caso de alimentos que presenten una cubierta natural (huevos, ostras, etc), la modificación en la preparación de la muestra se especificará en la norma particular.

6.4 HOMOGENEIZACION Y PREPARACION DE LAS DILUCIONES

6.4.1 Muestras solidas

6.4.1.1 Se pesan 10, 25 o 50g \pm 0,1 de la muestra en una jarra, frasco apropiado o en bolsas de polietileno, estériles, previamente tarados.

6.4.1.2 Se añaden 90, 225 o 450 ml de diluyente respectivamente (solución tampón fosfato o agua peptonada al 0,1 %).

6.4.1.3 Se homogeneiza por no más de 2 minutos a 8000 r.p.m.. Debe esperarse 2 - 3 minutos hasta que desaparezca la espuma formada. En el caso de emplearse un homogeneizador mecánico (Stomacher) se agita la muestra por un tiempo de 60 segundos.

NOTA 1: En el caso de alimentos sólidos cuya flora microbiana está limitada a la superficie (mani, nueces, almendras, pasas, aceitunas sin deshuesar u otros) se pesan 50 g y se añaden 50 ml del diluyente, se agita vigorosamente 50 veces en un ángulo de 45°. Cada ml de la solución de enjuague será equivalente a 1 g de muestra.

NOTA 2: Cuando se analicen alimentos con alto contenido de grasa (mayor de 20%) o polvos que formen grumos, pueden añadirse al diluyente, agentes humectantes tales como el tergitol 7 aniónico (1% p/v) para facilitar la emulsificación (Ej: Quesos, crema de leche, mantequilla, chorizo, albúmina).

NOTA 3: Se recomienda tomar siempre que sea posible, la mayor cantidad de muestra (50 g) a fin de obtener resultados más confiables.

6.4.2 Muestras líquidas

6.4.2.1 Se miden con una pipeta 10 u 11 ml de la muestra y se transfieren a un frasco de dilución que contenga 90 o 99 ml respectivamente de diluyente (tampón fosfato o agua peptonada). En el caso de muestras muy viscosas (Ej: Chicha, jarabes, leche condensada, yogurt, crema de leche, pulpas de frutas) éstas deben pesarse. En el caso de muestras líquidas con elevada cantidad de gas (refrescos, malta, agua mineral gasificada) deben trasvasarse a un recipiente estéril y agitar por rotación durante 15-30 minutos hasta que liberen el gas.

6.4.2.2 La muestra se agita luego 25 veces, bien sea por un movimiento del brazo en un ángulo de 45° o por rotación del recipiente en diferentes sentidos.

NOTA: La homogeneización de la muestra, bien sea sólida o líquida en la forma antes descrita, corresponde a la primera dilución (10^{-1}).

6.4.2.3 A partir de la primera dilución obtenida en 6.4.2.1 y 6.4.2.2 se procede de inmediato a preparar las diluciones necesarias de la siguiente forma:

6.4.2.3.1 Se mide 1 ml de la dilución 10^{-1} y se transfiere a un tubo que contenga 9 ml de diluyente o 10 u 11 ml de la dilución 10^{-1} y se transfiere a un frasco de dilución que contenga 90 o 99 ml respectivamente de diluyente para obtener la dilución 10^{-2} .

Se agita el tubo o frasco utilizado 25 veces, bien sea por un movimiento del brazo en un ángulo de 45° o por rotación del recipiente en diferentes sentidos.

6.4.2.3.2 Se repite este procedimiento a fin de obtener las otras diluciones necesarias para el análisis (10^{-3}), (10^{-4}) etc. o aquellas que según la experiencia necesite el alimento o microorganismo objeto de análisis.

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

BIBLIOGRAFIA

- a.- ICMSF. 1980. Microorganisms in foods. 1. Their significance and methods of enumeration. The International Commission on Microbiological Specification of foods. Editorial University of Toronto Press. Toronto. Canada.
- b.- APHA. 1984. Compendium of Methods for Microbiological Examination of foods. 2nd edition. M. Speck, Editor Washington D.C.
- c.- FDA. 1984. Bacteriological Analytical Manual. Food and Drug Administration, Bureau of Foods Division of Microbiology. 6th. Edition. ADAC. Box 50. Benjamin Franklin Station. Washington. DC 20044. U.S.A.
- d.- ICMSF. 1986. Microorganisms in foods. Sampling for microbiological analysis. Principles and Specific applications. 2nd edition. University of Toronto Press.

ANEXO 1
FORMULA Y PREPARACION DE LOS DILUYENTES REQUERIDOS PARA LA
PREPARACION DE MUESTRAS PARA EL ANALISIS MICROBIOLOGICO

COVENIN
1128-88

1. Solución tampón fosfato a pH 7.2 (Solución de Butterfield)

1.1 Solución madre

1.1.1 Fórmula

Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) 34 g
Agua destilada C.s.p. 1000 ml

1.1.2 Preparación:

Se disuelve el fosfato diácido de potasio en 500 ml de agua destilada, se ajusta a pH 7,2 con aproximadamente 175 ml de NaOH 1N. Se diluye a 1 litro, se esteriliza a 121°C por 15 minutos y se almacena bajo refrigeración.

1.2 Solución de trabajo

Se diluye 1,25 ml de solución madre hasta 1 litro con agua destilada. Se reparte la solución en frascos o tubos de dilución adecuados. Se esteriliza a 121°C por 15 minutos.

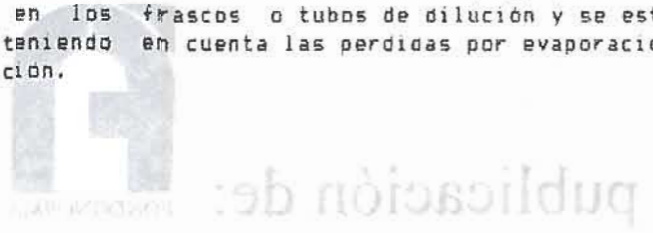
2. Agua peptonada al 0,1 %

2.1 Fórmula

Peptona 1,0 g
Agua destilada 1000 ml

2.2 Preparación:

Se disuelve la peptona en el agua destilada y se ajusta el pH del medio de manera que después de la esterilización sea de $7,0 \pm 0,1$. Se distribuye en porciones adecuadas en los frascos o tubos de dilución y se esteriliza a 121 °C por 15 minutos, teniendo en cuenta las pérdidas por evaporación que ocurren durante la esterilización.



INIA - COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES
Calle 25 de Agosto, No. 100, Caracas, Venezuela
Tel. (0212) 923.1111

**COVENIN
1126 - 89**

**CATEGORIA
C**

**COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES
MINISTERIO DE FOMENTO**

Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12

Telf. 575. 41. 11 Fax: 574. 13. 12

CARACAS

publicación de:



CDU: 641.576.8.08

ISBN: 980 - 06 - 0382 - 4

Cualquier traducción o reproducción parcial o total de la presente
Norma deberá ser autorizada por el Ministerio de Fomento