


<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

# **Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones**

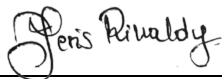


**AOXLAB S.A.S**

	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

## DOCUMENTO CONTROLADO


### PROC-TC-199 Preparación de homogenizados y diluciones

**Copia controlada No. :1**

	Nombre	Puesto función	Firma	Fecha
<b>Elaboró:</b>	Yeris Mercedes Rinaldy M.	Analista de microbiología		2025-05-17
<b>Revisó:</b>	Lorena Correa Restrepo	Líder de laboratorio		2025-05-20
<b>Aprobó:</b>	Jonatan Zárate Álvarez	Director técnico		2025-05-20
<b>Localización del documento:</b>		Plataforma SGC		


### Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2020-07-29	1	Ninguno (versión original).	YLCR	DPP	YELP
Obsoleto	2021-11-16	2	Se realiza cambio de temperatura del laboratorio, se ajusta al estilo establecido en el manual de identidad y otros aspectos de forma	YLCR	DPP	YELP
Obsoleto	2022-11-05	3	Se modifica el tiempo de exposición de las placas inoculadas con la cepa <i>Aspergillus brasiliensis</i> , indicado en el numeral 2.2 y el tiempo requerido en la desinfección de la cabina en el numeral 4.1.3	YMRM	APPP	DPP
Vigente	2025-05-20	4	Se actualizó el protocolo con programación horaria, criterios de limpieza y verificación por matriz.	YMRM	APPP	DPP

	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

### índice

1.	OBJETIVO Y ALCANCE.	4
2.	DEFINICIONES Y NOTACIONES.	5
3.	REFERENCIAS.	6
4.	DESARROLLO.	8
4.1	Actividades previas.	8
4.1.1	Inspección de la muestra.	8
4.1.2	Estabilización.	8
4.1.3	Verificación de equipos y áreas de ensayo	9
4.1.4	Manejo de la muestra.	9
4.1.5	Medidas de seguridad.	9
4.2	Patrones y equipos de medición.	10
4.3	Materiales y consumibles	10
4.4	Reactivos y/o soluciones	11
5.	METODOLOGÍA	11
6.	Aseguramiento de la calidad	21
8.	RESPONSABILIDADES.	22
10.	FORMATOS RELACIONADOS.	24
11.	ANEXOS.	24

	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE.

### 1.1 Objetivo


Brindar las directrices generales para la preparación de las muestras, con el fin de lograr la liberación de los microorganismos que éstas puedan contener al agua de dilución para su posterior recuperación y recuento.

### 1.2 Alcance

Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método
Preparación de suspensión inicial y diluciones seriadas	ISO 6887-1, ISO 6887-2, ISO 6887-3, ISO 6887-4, ISO 6887-5	N.A

Este método se aplica a las siguientes matrices

- Alimento animal
- Alimentos elaborados
- Bebidas (Jugos o pulpas de fruta pasteurizadas o no)
- Café y derivados
- Carne
- Cereales y productos
- Confitería
- Frutas
- Leche y productos lácteos
- Materia prima
- Producto en proceso
- Producto terminado
- Productos de coco
- Suplementos alimenticios
- Material vegetal
- Extractos oleosos de cannabis
- Cristales de CBD

	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

## 2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

### 2.1 Definiciones.

**Muestra de laboratorio [4]:**

Muestra preparada por envío de un laboratorio y utilizada para usar en la preparación de las suspensiones iniciales

**Muestra de ensayo [4]:**

Muestra representativa medida (volumen o peso) tomada de la muestra de laboratorio para usarla en la preparación de la suspensión inicial

**Suspensión inicial (dilución primaria) [4]:**

Suspensión, solución o emulsión obtenida después de que una cantidad pesada o medida del producto que se examina se ha mezclado con, normalmente nueve veces la cantidad de diluyente, lo que permite que, si hay presentes partículas grandes, se asienten o se suspendan.

**Diluciones decimales adicionales [4]:**

Suspensiones o soluciones obtenidas mezclando un volumen medido de la suspensión inicial con un volumen de nueve veces de diluyente y repitiendo esta operación con diluciones adicionales, hasta obtener una serie de diluciones decimales, adecuadas para la inoculación en el medio de cultivo.

**Homogenizado [4]:**

Resultado del proceso de mezclar el producto, hasta observarse uniforme, en una sola fase.


**Dilución [4]:**

Resultado del proceso de mezclar una sustancia con un líquido hasta que se incorporan.

**Análisis microbiológico [1]:**

Procedimiento que se sigue para determinar la presencia, identificación, y cantidad de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en una muestra.

**Límites microbiológicos [1]:**

	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión:</b> 4
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

Son los valores permisibles de microorganismos presentes en una muestra, que indican la aceptabilidad higiénico-sanitaria de una superficie.

**Incubadora [1]:**

Cámara aislada que permite que la temperatura se mantenga estable y uniformemente distribuida dentro del rango de error de temperatura máximo permisible especificado en el método de ensayo.

**Calibración [2]:**

Proceso de comparar los valores obtenidos por un instrumento de medición con la medida correspondiente de un patrón de referencia (o estándar).

**2.2 Notaciones.**

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:

**“Laboratorio”:** se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.

**“Informe de resultados”:** se refiere a los informes de ensayo que emite el Laboratorio.

**“Servicios”:** para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

**3. REFERENCIAS.**

[1] NTC 4092:2009 Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos-

[2] Vocabulario internacional de metrología: conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). 1er edición en español, 2008

[3] Análisis microbiológico de los alimentos metodología analítica oficial microorganismos indicadores volumen 3

[4] ISO 6887-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension, and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

[5] ISO 6887-2, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension, and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products

<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

- [6] ISO 6887-3, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension, and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products
- [7] ISO 6887-4, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension, and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products meat and meat products, and fish and fishery products
- [8] ISO 6887-5, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension, and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products
- [9] Bacteriological Analytical Manual. Chapter 5, Salmonella. December 2007 Edition. FDA U.S. Food and Drug Administration

<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

#### **4. DESARROLLO.**

##### **4.1 Actividades previas.**

###### **4.1.1 Inspección de la muestra.**

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, éste es inspeccionado a fin de asegurar que se garantizan las condiciones conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".

Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que la muestra se encuentra empacada y sellada herméticamente, y etiquetada con el sticker de identificación interna del laboratorio. Las muestras con cadena de frío deben venir con el refrigerante que garantice esta condición. Registrar la toma de temperatura al testigo y registrar en el software analítica <https://analitica-aoxlab.com/analitica/>

La temperatura a la cual ingresan las muestras, esta labor es realizada por el auxiliar de laboratorio haciendo uso del anexo del procedimiento PROC-TC-008. Para el caso de las muestras que son enviadas directamente por el cliente a las instalaciones del laboratorio se tomará la temperatura al ambiente del contenedor de esta.

Se debe contar con al menos 100 g de muestra para realizar los diferentes análisis


En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de laboratorio.

###### **4.1.2 Estabilización.**

Una vez revisada la muestra, se aplican las siguientes instrucciones:

Los patrones y equipos de referencia del laboratorio a intervenir en el ensayo como son las balanzas se mantienen en el lugar de ensayo encendidas, antes de realizar las mediciones, a fin de lograr su operación óptima o estabilización térmica. Las muestras que están en refrigeración se sacan al menos 10 minutos antes de realizar los ensayos y las que no requieren refrigeración se mantienen en el lugar de ensayo para que tengan una estabilidad térmica. Los diluyentes para las suspensiones que estén en refrigeración se deben sacar 1 hora antes de refrigeración para que tomen temperatura ambiente o colocarlas entre 15 y 20 minutos en la incubadora a 37 °C.

Debe verificarse que las condiciones ambientales del lugar de ensayo se encuentren en los intervalos que se muestran a continuación:

	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

Condición ambiental	Mínima	Máxima	Observación
Temperatura ambiente	18,00	27,00	Condiciones establecidas por el laboratorio
Humedad relativa	20,00	80,00	Condiciones establecidas por el laboratorio

Estas condiciones son monitoreadas y registradas automáticamente por el software 3sense del laboratorio y en caso de que se encuentren fuera de estos rangos deben suspenderse los análisis.

#### 4.1.3 Verificación de equipos y áreas de ensayo

A fin de confirmar que los equipos a utilizar en el ensayo se encuentran en condiciones adecuadas para realizar el servicio, se inspecciona que se haya realizado la verificación diaria de la balanza gramera y/o diluctor gravimétrico de acuerdo con el procedimiento PROC-TC-005. Así mismo, se debe garantizar la desinfección de la cabina y encendiendo la fuente de luz UV durante por lo menos 60 minutos. Antes de cada ensayo, debe verificarse que se haya realizado la limpieza y desinfección de mesones e implementos a utilizar de acuerdo con el procedimiento PROC-TC-031 y la correcta limpieza y desinfección de los materiales, siguiendo las directrices establecidas en los procedimientos PROC-TC-026 y PROC-TC-027.


#### 4.1.4 Manejo de la muestra.

Para la identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, se siguen las instrucciones dadas en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

Al tomar de la porción de análisis, la muestra debe estar a temperatura ambiente y correctamente homogenizada a excepción de las muestras que requieran almacenarse en refrigeración que se sacan 10 minutos antes de su análisis.

#### 4.1.5 Medidas de seguridad.

Se deben seguir las siguientes medidas de seguridad antes y durante la realización del servicio: Verificar que el sticker de calibración y mantenimiento de los equipos (Incubadoras, balanzas) se encuentren vigentes y no requiere alguna intervención. Verificar que todos los reactivos preparados en el laboratorio al momento de realizar el ensayo o los que se encontraban almacenados se encuentren identificados conforme al formato FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio" y Verificar que ninguno se encuentre vencido. En caso de que se encuentre alguna anomalía al respecto, avisar a la Dirección Técnica a través del Líder de Laboratorio.

	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

Antes de realizar los ensayos, debe tenerse en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar ningún paso.

Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC- 015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S, capítulo XIV.

#### 4.2 Patrones y equipos de medición.

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes equipos y componentes clave:

- Balanza gramera con resolución de 0.01 g
- Vortex
- Transfer pipeta de 100 µL ,1000 µL y 10 mL
- Cabina de bioseguridad
- Baño serológico
- Homogenizador de muestras (Stomacher)
- Dilucult (Equipo de pesaje y dilución de muestras)
- Lampara Germicida (siembra) EL607
- Lampara Germicida (pesaje) EL608

#### 4.3 Materiales y consumibles

- Puntas para transfer pipeta de 100 µL, 1000 µL y 10 mL
- Bolsas whirl pak estériles 18 a 24 onzas
- Clips para bolsas stomacher
- Tubos de ensayo
- Cucharas, cuchillo, espátulas, pinzas, tenedores, tijeras estériles.
- Probeta de 100 mL
- Gradillas
- Alcohol 70%
- Mechero
- Guantes de nitrilo
- Toallas de papel desechables
- Candela
- Gasas estériles

El material reutilizable debe haber sido previamente lavado, secado y esterilizado (**Ver PROC-TC 026-027**)

<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

#### 4.4 Reactivos y/o soluciones

- Agua peptonada en volúmenes de 1 litro y 9 mL
- Agua peptonada tamponada en volúmenes de 1 litro y 9 mL
- Tween 80<sup>®</sup> monooleato de sorbitan
- Caldo letheen modificado o caldo letheen
- Caldo Demi fraser con suplemento
- Caldo tripteina de soja (CASO)

La preparación de estas soluciones se detalla en el PROC-TC-206 "Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo". Utilizando como cantidad de reactivo lo especificado por la casa comercial en el inserto y utilizando como diluyente agua destilada.

El registro de la preparación de estas soluciones se diligencia en el **FOR-TC 045**

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

#### 5.1.1 Muestras Congeladas

Llevar la muestra a temperatura ambiente (20 – 25° C) y luego realizar la prueba lo más rápidamente posible.

Para el proceso de descongelación se pueden utilizar cualquiera de las siguientes opciones:

-Descongelar durante un tiempo máximo de 18 horas a una temperatura de 2°- 8°C

-Descongelar por 2 horas a temperatura ambiente (20 – 25° C)


-Descongelar durante un tiempo máximo 30 minutos a una temperatura de 30°C (preferiblemente con agitación continua en un baño de temperatura controlada), utilizando el recipiente en el que se recibió la muestra en el laboratorio. Agitar muy bien el recipiente de la muestra hasta que la muestra se haya disuelto por completo.

En el caso de productos lácteos congelados (incluyendo el helado), diluir la muestra en una cantidad de diluyente precalentado (a 37° C) equivalente a 9 veces la cantidad de muestra y colocar la muestra diluida en un baño de maría a 37° C durante 30 minutos. Luego, proceder con las diluciones posteriores como se acostumbra.

Las muestras se homogenizan en el Stomacher durante 1 minuto

#### Muestras Semisólidas y Líquidas

Las muestras líquidas se deben agitar de forma manual antes del muestreo, para esto se invierte el envase 25 veces, con el fin de garantizar que los microorganismos estén distribuidos de manera uniforme. Las bebidas con gas se deben invertir con cuidado unas cuantas veces para mezclarlas

	<p align="center"><b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b></p> <p align="center"><b>AOXLAB S.A.S</b></p>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión:</b> 4
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

bien. Después de medir la muestra correspondiente, se deben transferir las cantidades directamente, con pipetas, a recipientes que contienen el líquido de dilución.

Los productos semisólidos (como, por ejemplo, mayonesa) se pesan en una bolsa *whirl-pak* directamente con una espátula o cuchara estériles, se adiciona el diluyente y luego se homogeniza en el Stomacher durante 1 minuto.

Nota: El intervalo de tiempo entre el mezclado y la remoción del alícuota de prueba no debe ser mayor a 3 minutos.

### **Muestras Secas.**

Se pesa la cantidad necesaria de forma analítica y de acuerdo con el microorganismo a evaluar en una bolsa *whirl-pak*.

Para disolver, se agita lentamente la muestra contenida en la bolsa *whirl-pak* con el diluyente y luego, se lleva al *Stomacher* durante 1 minuto.

Para recuperar organismos posiblemente dañados, se debe garantizar la hidratación lenta de las muestras secas (por ejemplo, leche en polvo en el caso del análisis de *Salmonella*) con el fin de minimizar el efecto del choque osmótico. Con ese fin, se añade la cantidad requerida de muestra sobre la superficie de 1/5 del diluyente y se deja rehidratar durante 15 minutos como mínimo. Seguidamente, se añade el resto del diluyente y se mezcla.

Para el caso de harinas se precalienta el diluyente en un baño maría a 45 °C

### **Latas**

La lata se mezcla volteándola hacia arriba y hacia debajo de 10 a 12 veces

Dependiendo del tipo y de la consistencia del material de muestra, se debe pesar o transferir con pipeta la cantidad correspondiente en forma higiénica

Cuando se deben examinar muchas latas de alimentos en conserva, por razones de espacio resulta más sencillo transferir los materiales de muestra asépticamente de las latas hacia recipientes más pequeños y usar estos recipientes para análisis posteriores.

### **Productos Sólidos**


Dividir la muestra asépticamente en piezas más pequeñas para preparar la muestra de prueba.

Algunos productos pueden requerir que se haga uso de bolsas *whirl-pak* con filtro para que se puedan reducir interferentes a la hora de sembrar en las cajas de Petri

A la hora de tomar muestras de productos que contienen varios ingredientes (alimentos listos para servir, pasteles, aperitivos, etc.), es necesario asegurarse de que todos los ingredientes del producto se examinen.

Homogenizar las muestras en *Stomacher* durante 1 minuto

### **Productos con alto contenido en grasas (más de un 20% de su masa total)**

	<p align="center"><b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b></p> <p align="center"><b>AOXLAB S.A.S</b></p>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

El uso de un diluyente con monooleato de sorbitan (nombre comercial Tween 80®) añadido en cantidades desde 1g/L a máximo 10 g/L, definido por la formación de una emulsión, lo cual, a su vez, está relacionado con el contenido de grasa. Es decir, se puede empezar a usar desde 1g/L e ir aumentando la dosis hasta que se observe que se haya emulsificado la muestra.

### **Casos Especiales:**

#### **Aceitunas, vegetales en vinagre, condimentos.**

En la mayoría de los casos, el líquido contenido en estos productos se puede usar para su análisis. En otros casos, los ingredientes líquidos y gruesos se mezclan en homogenizan en el Stomacher durante 1 minuto.

Antes de transferir el material de muestra con pipetas, los ingredientes gruesos (residuos de alimentos, etc.) se dejan asentar primero para evitar inexactitudes y problemas durante la transferencia de productos.

#### **Chocolate**

El chocolate y los productos de chocolate se mezclan con leche descremada UHT precalentada (37 – 42° C) para la detección de *Salmonella*. También puede usarse 100 g de leche en polvo y disolver en un litro de agua destilada; en todo caso la leche se debe esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C antes de su uso para descartar contaminación cruzada. Para llevar a cabo otras pruebas, se debe triturar con los dedos el producto y disolver la muestra con el diluyente (agua peptonada precalentada a 45° C hasta que esté totalmente disuelto; luego, dejar reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.

En el caso de cacao en polvo, se debe agitar la primera dilución, durante 5 minutos a 45° C, dejar reposar y luego homogenizar en el Stomacher durante 1 minuto.

#### **Gelatina**

Pesar la muestra

Adicionar el diluyente


Agitar y dejar reposar a temperatura ambiente entre 15 y 20 minutos

Colocar a baño de maría a una temperatura de 45° C hasta que la gelatina se disuelva (20 minutos aproximadamente)

Agitar por 1 minuto en el stomacher

#### **Gomas**

Mezclar la muestra con el diluyente, luego dejarlo reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente para reactivar los microorganismos dañados subletalmente. Posteriormente, homogenizar por 1 minuto en el stomacher.

	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

### **Carnes y derivados cárnicos**

Mezclar la muestra con el diluyente, la cual debe ser molida para incrementar su área superficial, agitar en el stomacher durante 1 minuto y procesarlos rápidamente, con el fin de evitar un sobre crecimiento microbiano.

### **Productos Higroscópicos (Ejemplo: como cereales)**

Estos materiales se muelen y requiere una dilución de 1:20 debido a que los cereales absorben líquidos (se saturan) y sería imposible trabajar con diluciones menores, se agitan por 5 minutos el stomacher para garantizar un completa homogenización.

#### **5.1.7.7 Cosméticos**

En el caso de cosméticos el diluyente a utilizar es caldo *Lethen* o caldo *Lethen* modificado

### **Almidón de maíz**

Se deben pesar 50 g de muestra y se adicionan 450 mL de agua peptona tamponada para análisis de *Salmonella sp.*

Suspensión inicial

#### **5.2.1. Microorganismos indicadores**

(Aplica para análisis de: aerobios mesófilos, mohos y levaduras, coliformes totales y *E. Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, lactobacillus, esporas de clostridium, enterobacterias)

#### **Cuando se usa balanza:**

Mezclar muy bien la muestra para asegurar su homogenización antes de preparar las diluciones: Desinfectar con alcohol al 70 % el sitio por donde se vaya a extraer la muestra

Encender el mechero y colocarlo al lado de la balanza donde se pesan las muestras.

Desinfectar el empaque de las muestras con un poco de alcohol. Abrir aséptica y adecuadamente la muestra, haciendo uso de guantes previamente desinfectados con alcohol.

Colocar un beaker encima de la balanza y meter una bolsa *whirl pak* dentro de este, anotar el peso en el FOR-TC-075

Adicionar 10 g representativos de la muestra total (tomando tanto de la superficie como de su interior) con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  una cantidad de masa x g o medir con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  un volumen x mL (como mínimo 10 g o 10 mL a menos que se indique otra cantidad). Anotar el peso en el FOR-TC-075

Añadir 90 mL  $\pm 5\%$  de agua peptonada para obtener una dilución de  $10^{-1}$  Agregar una cantidad del diluyente igual a 9 x g o 9 x mL (dilución 1/10) y homogenizar entre 1 minuto a 3 minutos dependiendo del alimento. La temperatura del diluyente debería ser aproximada a la temperatura ambiente, para evitar daños de los microorganismos por cambios bruscos. NOTA: En algunos casos,

<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

particularmente para los productos muy viscosos o espesos, podría ser necesario agregar mayor cantidad de diluyente lo cual debe tenerse en cuenta en las operaciones subsiguientes y / o en la expresión de resultados. Anotar el peso en el FOR-TC-075

Para alimentos con un elevado contenido en grasa (superior al 20%), es necesario añadir 1% de Tween 80 o de otro tensoactivo no tóxico.

Dejar reposar entre 10 a 15 minutos para continuar con la preparación de las diluciones sucesivas.

#### **Cuando se usa dilucult:**

Mezclar muy bien la muestra para asegurar su homogenización antes de preparar las diluciones:

Desinfectar con alcohol al 70 % el sitio por donde se vaya a extraer la muestra

Encender el mechero y colocarlo al lado del dilucult donde se pesan las muestras.

Desinfectar el empaque de las muestras con un poco de alcohol. Abrir aséptica y adecuadamente la muestra, haciendo uso de guantes previamente desinfectados con alcohol.

Abrir una bolsa *whirl pak* y colocar sobre la bandeja, dejándola sostenida sobre las bandas adhesivas, tarar el peso de la bolsa.

Adicionar 10 g representativos de la muestra total (tomando tanto de la superficie como de su interior) con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  una cantidad de masa x g o medir con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  un volumen x mL (como mínimo 10 g o 10 mL a menos que se indique otra cantidad). Anotar el peso en el FOR-TC-075

Verificar que el equipo se encuentre en modo dilución y adicional que tenga la dilución 1:10, proceder a dispensar usando el botón GO, verificando que se seleccione la bomba del lado que se encuentre conectado el caldo de dilución requerido para cada muestra. Esperar que el equipo de la señal de finalización de dispensación del diluyente cuando suene un pitido y se procede a anotar el valor del peso arrojado en el FOR-TC-075.

#### **5.2.2. Microorganismos patógenos**

(Aplica solo para *Salmonella sp* y *Listeria sp*, incluida *Listeria monocytogenes*, *E. coli O157:H7*)

#### **Cuando se usa balanza:**

Mezclar muy bien la muestra para asegurar su homogenización antes de preparar las diluciones.


Desinfectar con alcohol al 70 % el sitio por donde se vaya a extraer la muestra

Encender el mechero y colocarlo al lado de la balanza donde se pesan las muestras

Desinfectar el empaque de las muestras con un poco de alcohol. Abrir aséptica y adecuadamente la muestra, haciendo uso de guantes previamente desinfectados con alcohol.

Colocar un beaker encima de la balanza y meter una bolsa *whirl pak* dentro de este, anotar el peso en el FOR-TC-075

Adicionar 25 g representativos de la muestra total (tomando tanto de la superficie como de su interior) con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  una cantidad de masa x g o medir con una

	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  un volumen x mL (como mínimo 25 g o 25 mL a menos que se indique otra cantidad). Anotar el peso en el FOR-TC-075

Añadir 225 mL  $\pm 5\%$  de agua peptonada tamponada para obtener una dilución de  $10^{-1}$  Agregar una cantidad del diluyente igual a 9 x g o 9 x mL (dilución 1/10) y homogenizar entre 1 minuto a 3 minutos dependiendo del alimento. La temperatura del diluyente debería ser aproximada a la temperatura ambiente, para evitar daños de los microorganismos por cambios bruscos. NOTA: En algunos casos, particularmente para los productos muy viscosos o espesos, podría ser necesario agregar mayor cantidad de diluyente lo cual debe tenerse en cuenta en las operaciones subsiguientes y / o en la expresión de resultados. Anotar el peso en el FOR-TC-075

Para alimentos con un elevado contenido en grasa (superior al 20%), es necesario añadir 1% de Tween 80® o de otro tensoactivo no tóxico.

Dejar reposar entre 10 a 15 minutos para continuar con la preparación de las diluciones sucesivas.

**Nota:** para el pretratamiento de muestras de salmonella en diferentes matrices ver anexo 2

#### **Cuando se usa dilucult:**

Mezclar muy bien la muestra para asegurar su homogenización antes de preparar las diluciones: Desinfectar con alcohol al 70 % el sitio por donde se vaya a extraer la muestra

Encender el mechero y colocarlo al lado del dilucult donde se pesan las muestras.

Desinfectar el empaque de las muestras con un poco de alcohol. Abrir aséptica y adecuadamente la muestra, haciendo uso de guantes previamente desinfectados con alcohol.

Abrir una bolsa *whirl pak* y colocar sobre la bandeja, dejándola sostenida sobre las bandas adhesivas, tarar el peso de la bolsa.

Adicionar 25 g representativos de la muestra total (tomando tanto de la superficie como de su interior) con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  una cantidad de masa x g o medir con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  un volumen x mL (como mínimo 25 g o 25 mL a menos que se indique otra cantidad). Anotar el peso en el FOR-TC-075

Verificar que el equipo se encuentre en modo dilución y adicional que tenga la dilución 1:10, proceder a dispensar usando el botón GO, verificando que se seleccione la bomba del lado que se encuentre conectado el caldo de dilución requerido para cada muestra. Esperar que el equipo de la señal de finalización de dispensación del diluyente cuando suene un pitido y se procede a anotar el valor del peso arrojado en el FOR-TC-075.

#### **5.2.3. ANÁLISIS PARA ENJUAGUES DE AVES BENFICIADAS Y OTROS ENJUAGUES:**

Agitar vigorosamente el enjuague para asegurar su homogenización antes de realizar la suspensión inicial en el medio diluyente. Desinfectar con alcohol al 70% el frasco o bolsa, en la cual se encuentra el enjuague y de ser posible flamear con ayuda del mechero. Abrir aséptica y adecuadamente el frasco o bolsa que contiene el enjuague. Tomar 10 mL del enjuague (con una incertidumbre de medición máxima de 5% (equivalente a  $\pm 0.5$  mL) y llevar a un frasco de dilución que contenga 90 mL de diluyente (agua peptonada), lo que corresponderá a la dilución inicial ( $10^{-1}$ ), se puede hacer

<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

también midiendo 25 mL ( $\pm 1.25$  mL) de ítem de ensayo en 225 mL del mismo caldo diluyente. Agitar vigorosamente el frasco. Dejar en reposo 10 minutos.

Para análisis de *Salmonella spp* o *Listeria monocytogenes* a partir de enjuagues, tomar 30 mL del enjuague y llevar a 30 mL de agua peptonada tamponada o 30 mL de caldo fraser, respectivamente. Agitar y llevar a incubación según condiciones requeridas para cada análisis.

#### **5.2.4. ANÁLISIS DE CARNES POR METODO DE ESPONJA:**

Desinfectar con alcohol al 70% la bolsa que contiene la esponja y abrirla asépticamente. Oprimir la esponja desde el exterior de la bolsa con el fin de extraer el caldo empleado para la toma del ítem. Se deben extraer 10 mL  $\pm$  0.5 mL del caldo diluyente. Llevar los 10 mL del caldo de dilución extraídos de la esponja a un frasco que contenga 90 mL de diluyente (agua peptonada), lo que corresponderá a la dilución inicial ( $10^{-1}$ ). Agitar vigorosamente el frasco. Dejar en reposo 10 minutos. Para análisis de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* o *E. Coli O157:H7* a partir de esponjas, tomar 50 mL de agua peptonada tamponada o demi fraser y llevarlos a la bolsa que contiene la esponja o llevar la esponja con el caldo de dilución restante a frasco con 50 mL de agua peptonada tamponada o caldo demi fraser, según corresponda. Agitar y llevar a incubación según condiciones requeridas para cada análisis.

#### **Preparación de las diluciones seriadas para recuento en placa:**


Pipetear 1 mL  $\pm 5$  % del sobrenadante sin agitar de la dilución  $10^{-1}$  en un tubo que contiene 9 mL de agua peptonada para obtener la dilución  $10^{-2}$ . Agitar cuidadosamente en vortex entre 10 a 15 segundos.

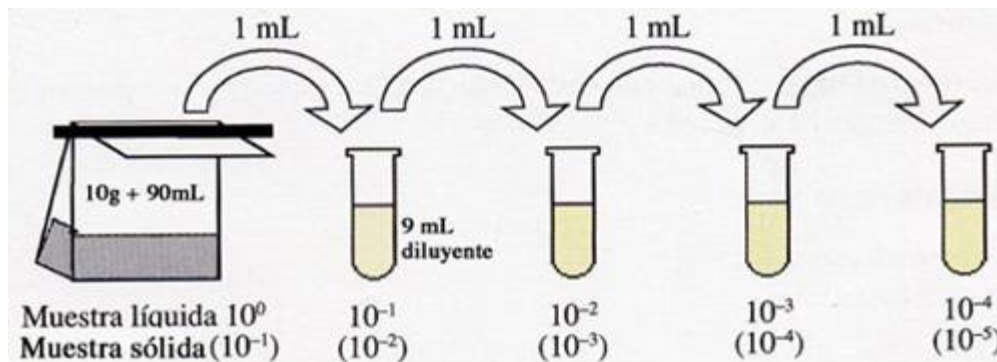
Pipetear 1 mL  $\pm 5$  % de la dilución  $10^{-2}$  en un tubo que contiene 9 mL de agua peptonada. obteniendo así la dilución  $10^{-3}$ . Agitar cuidadosamente en vortex durante 10 a 15 segundos.

Repetir este procedimiento de tubo en tubo hasta obtener la dilución deseada de acuerdo con cada alimento a analizar. En muestras que se considere que puedan tener recuentos altos se recomienda realizar una dilución hasta  $10^{-3}$

Cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración (conocido como dilución seriada en base 10).

El rango de diluciones preparadas y sembradas puede modificarse en función a la cifra de microorganismos esperada, es decir de acuerdo con la naturaleza del ítem de ensayo y dependiendo del análisis que se vaya a realizar. (ver anexo 1)

	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>



Grafica 1: Diluciones seriadas

**Nota:** Tener en cuenta el factor de dilución dependiendo de la naturaleza de la muestra (líquida o sólida).

#### 5.4 Duración del procedimiento

El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe superar los 45 minutos, mientras que el lapso límite entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de la preparación de las diluciones decimales sucesivas es de 30 minutos.

**NOTA:** si la temperatura ambiente del laboratorio es muy alta (más de 28°C) estos dos lapsos de tiempo deben ser reducidos.


#### 5.5 Procesamiento diferenciado por matriz en el área de Microbiología

El Laboratorio ha establecido un protocolo para análisis microbiológico que garantice la integridad de los resultados mediante la separación y programación diferenciada de muestras según su matriz, minimizando el riesgo de contaminación cruzada, incluyendo, pero no se limitan a: aguas, alimentos, cosméticos, frotis superficies, frotis de manos, productos farmacéuticos (cannabis) y materias primas, material de empaque. Este protocolo empieza con:

##### 5.5.1 Clasificación de Matrices:

Las muestras se agrupan en las siguientes categorías:

- Aguas: Potable, aguas envasadas, agua natural.
- Alimentos: Crudos, procesados, listos para consumo.
- Cosméticos: Productos terminados y materias primas.
- Frotis: Superficies, manos, utensilios.

	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

- Bebidas: alcohólicas y no alcohólicas.
- Material estéril de contacto con alimentos: empaques, corchos, láminas de polipropileno, envases, etc.
- Productos farmacéuticos (material vegetal cannabis, extracto oleosos cannabis, extracto CBD), suplementos, etc.
- Alimento animal: producto terminado y materias primas.

#### 5.5.2 Programación de Análisis:

- Se establece una programación escalonada para el análisis de cada tipo de matriz, evitando el procesamiento simultáneo de diferentes tipos de muestras.
- La programación se define diariamente a inicio de cada jornada por el líder de microbiología donde se prioriza el análisis de matrices con mayor riesgo de contaminación cruzada en horarios separados.

#### 5.5.3 Condiciones de Procesamiento:

- Cada matriz se analiza en tandas independientes, con limpieza y desinfección del área, equipos, y materiales antes y después de cada grupo.
- Se utilizan insumos exclusivos o debidamente esterilizados para cada tipo de muestra.
- El personal debe cambiar guantes entre matrices.

#### 5.5.4 Limpieza y Desinfección:


- Se realiza la limpieza y desinfección del área de trabajo entre cada tanda de análisis, incluyendo la cabina de bioseguridad. Esta debe permanecer expuesta a luz ultravioleta durante 60 minutos. La limpieza se efectúa utilizando una solución de jabón neutro y el desinfectante correspondiente, según la rotación semanal establecida en el Anexo PROC-TC-031."

#### 5.5.5 Programación horaria de áreas de proceso y uso de cabina de bioseguridad:

Horario	Matriz asignada	Actividad
7:30 a.m. – 8:30 a.m.	Limpieza y desinfección, exposición de luz ultravioleta en cabina	Inicio de jornada
8:30 a.m. – 9:30 a.m.	Material estéril de contacto con alimentos, pruebas de esterilidad comercial, análisis de bebidas alcohólicas y no alcohólicas	Realizar dentro de cabina de bioseguridad con flujo de aire encendida. Final de actividad: Limpieza y desinfección de equipo.

<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

<b>Horario</b>	<b>Matriz asignada</b>	<b>Actividad</b>
9:30 a.m. – 10:30 a.m.	Frotis: Superficies, manos, utensilios.	Desinfección de cabina con alcohol al 70%
11:00 a.m. – 13:00 p.m.	Prueba molecular de patógenos y subcultivo en caldos selectivos seguido de siembra en medios sólidos selectivos y pruebas de confirmación.	Realizar dentro de cabina de bioseguridad con o sin flujo de aire encendida. Final de actividad: Limpieza y desinfección de equipo.
13:00 p.m. – 14:00 p.m.	— Almuerzo / limpieza —	Pausa operativa y aplicación de desinfectante por aspersión en áreas críticas según rotación establecida de solución desinfectante.
14:00 p.m. – 14:30 p.m.	Cosméticos y Productos farmacéuticos (extractos cannabis y cristales de CBD)	Análisis de productos terminados o materias primas. Final de actividad: desinfección de equipo y aspersión de áreas
14:00 p.m. – 16:30 p.m.	filtración de aguas	Realizar en área de filtración de aguas con respectivos controles en proceso dos veces por semana Final de actividad: Limpieza y de mesones
14:30 p.m. – 16:00 p.m.	Alimentos: listos para consumo, suplementos alimenticios y alimentos terminado de bajo riesgo microbiológico	Realizar dentro de cabina de bioseguridad con flujo de aire encendida. El pesaje se realiza con respectivos controles en proceso dos veces por semana Final de actividad: Limpieza y desinfección de equipos
16:00 p.m. – 17:00 p.m.	Alimentos: crudos y Alimento animal	Realizar dentro de cabina de bioseguridad con flujo de aire encendida. El pesaje se realiza con respectivos controles en proceso dos veces por semana

	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

Horario	Matriz asignada	Actividad
		Final de actividad: Limpieza y desinfección de equipos.

Durante la incubación, los caldos de enriquecimiento se organizan en bandejas plásticas separadas e identificadas por tipo de matriz y nivel de riesgo microbiológico, asegurando condiciones controladas y evitando la contaminación cruzada, ejemplo: productos terminados, cannabis, esponjas de superficies, cosméticos, frotis en tubos rediswabs de manera independiente.


Al finalizar la jornada, se realiza la aspersion de desinfectante en las áreas de trabajo y se programa la exposición a luz ultravioleta durante 60 minutos utilizando los equipos EL-607 y EL-608.

#### 5.5.5 Supervisión y Verificación:

- El líder de microbiología es responsable de verificar el cumplimiento del protocolo y supervisar condiciones de limpieza y desinfección de áreas de trabajo.

### 6. Aseguramiento de la calidad

Para asegurar y controlar la validez de los resultados, se debe garantizar que se cumplan todos los criterios mencionados durante el procedimiento, asegurar el control de esterilidad para cada lote del diluyente usado.

	<p align="center"><b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b></p> <p align="center"><b>AOXLAB S.A.S</b></p>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

## 7. RESPONSABILIDADES.

Director técnico.

Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.

Revisar y aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.

Asesorar y orientar los analistas en la resolución de dudas e inconvenientes surgidos durante el desarrollo de los ensayos.

Realizar o revisar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método y autorizar las indicaciones a seguir.

Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.

Director de Calidad.

Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.

Realizar y registrar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método.

Archivar los registros técnicos relacionados con los ensayos.

Líder de Laboratorio.

Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.

Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.

Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.

Informar al director técnico las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.

Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder de calidad y al director técnico.

Informar los casos en los que se deben de retener las muestras.


Supervisar el cumplimiento de las actividades de aseguramiento de calidad.

Analista.

Seguir todas las instrucciones establecidas en este procedimiento y en el reglamento del laboratorio Ingresar y entregar todos los resultados en los tiempos pactados.

Entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.

Realizar revisión de datos primarios y cálculos realizados en los cuadros de mandos, informar al líder del laboratorio en caso de observar alguna desviación en los resultados obtenidos teniendo en cuenta las cartas control.

	<p align="center"> <b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>   <b>AOXLAB S.A.S</b> </p>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

Registrar los resultados de los ensayos de control de calidad y hacer el análisis de tendencias de estos.


Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.

Informar al líder de laboratorio las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.

Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder del laboratorio.

Informar cualquier incidente que suceda durante la realización del método.

Revisar que los equipos usados en el desarrollo del método tengan mantenimiento, calibración y/o verificación vigente, de acuerdo con el programa de mantenimiento y calibración.

	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>


## 8. FORMATOS RELACIONADOS.

FOR-TC-075 “Formato para el registro de datos primarios de análisis microbiológicos”  
 FOR-TC-045 “Formato para el registro de información y asignación de lote de las soluciones preparadas para uso en los ensayos”


## 9. ANEXOS.

### ANEXO 1: diluciones recomendadas según el tipo de matriz por experiencia del laboratorio.

TIPO DE PRODUCTO	DILUCIONES MESOFILOS	DILUCIONES MOHOS Y LEVADURAS	DILUCION COLIFORMES TOTALES
Leche cruda	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup> , 10 <sup>-5</sup>	N.A	N.A
Leche pasteurizada y ultrapasteurizada	10 <sup>0</sup> y 10 <sup>-1</sup>	N.A	10 <sup>0</sup> y 10 <sup>-1</sup>
Leche saborizada, otro tipo de leches y derivados lácteos	10 <sup>-1</sup>	N.A	N.A
Salsas	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	N.A
Espicias y condimentos	10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	N.A
Alimentos preparados en restaurante y comidas rápidas	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>	N.A
Productos de panadería, pasabocas, dulces y chocolates	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	N.A
Cereales, mezclas de cereales, harinas, etc. (Crudas)	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	N.A
Jugos, pulpas y dulces de fruta no pasteurizados o de envase no hermético	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	N.A
Jugos, pulpas y dulces de fruta pasteurizados o de envase hermético	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	N.A
Refrescos líquidos o en polvo	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	N.A
Pastas alimenticias	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	N.A
Cárnicos y pollos crudos	N.A	N.A	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>
Cárnicos y pollos precocidos	N.A	N.A	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>
Cárnicos cocidos o escalados	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	N.A	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>

	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

TIPO DE PRODUCTO	DILUCIONES MESOFILOS	DILUCIONES MOHOS Y LEVADURAS	DILUCION COLIFORMES TOTALES
Pollo cocido	10 <sup>-1</sup>	N.A	N.A
Pescados, moluscos y mariscos crudos	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>
Pescados, moluscos, mariscos precocidos	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>
Pescados, moluscos y mariscos cocidos	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>
Concentrados para animales	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>
Materias primas para fabricación de concentrados animales	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>
Margarinas, grasas animales y vegetales	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	N.A
Suplementos alimenticios (endulzantes naturales)	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>
Productos precocidos congelados (yuca, papa francesa)	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	N.A
Material vegetal cannabis	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup> , 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup>
Cristales CBD cannabis	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	N.A
Extractos oleosos cannabis	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>	N.A
Café y derivados	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>
Cacao y derivados	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>
Cosméticos	10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	N.A

	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

## **ANEXO 2: Procedimiento para pre-enriquecimiento de algunas matrices para análisis de *salmonella sp***

### **Pre-enriquecimiento**

#### **Preparación de la muestra**

El siguiente método está basado en el análisis de unidades analíticas de 25 g en una dilución de 1:9, el volumen del diluyente depende del tamaño de la muestra compuesta (pool). Mantener la dilución 1:9 a menos que se dé otra especificación.

**.Procedimiento para huevos enteros, yema de huevo y clara de huevo desecados, leche líquida (entera, descremada, con 2% de grasas y suero), mezclas de polvo para preparaciones de (tortas, galletas, bizcochos, pan, etc.), fórmulas infantiles y de alimentación oral y parenteral que contengan huevo.**

Si el alimento es congelado, descongelar una porción conveniente tan rápidamente como sea posible para minimizar el crecimiento de microorganismos de la flora acompañante. Descongelar a 45°C durante 15 minutos con agitación continua en baño de agua termostáticamente controlado o descongelar durante 18 h entre 2°C y 5°C.

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 mL de caldo lactosa (CL). Agitar suavemente hasta disolución sin grumos. Dejar 60 minutos  $\pm$  5 minutos a temperatura ambiente, mezclar bien por agitación y determinar el pH con papel indicador. Si es necesario ajustar el pH a  $6.8 \pm 0.2$  con NaOH 1N o HCl 1N. Incubar 24 h  $\pm$  2 h a 35°C.

#### **Leche en polvo entera y descremada**

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 mL de solución de agua con verde brillante. Alternativamente unidades analíticas de 25 g pueden ser compuestas para formar un pool, en ese caso agregar la cantidad necesaria de solución de agua con verde brillante para llevar a dilución 1: 9.


NOTA: Preparar la solución de agua con verde brillante agregando 2 mL de una solución de Verde Brillante al 1 % a 1000 mL de agua destilada estéril.

Dejar 60 minutos  $\pm$  5 minutos a temperatura ambiente e Incubar 24 h  $\pm$  2 h a 35°C.

NOTA: Para leche entera no realizar muestras compuestas.

#### **Caseína**

**Caseína láctica:** Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente

	<p align="center"><b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b></p> <p align="center"><b>AOXLAB S.A.S</b></p>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión:</b> 4
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento Universal. Unidades analíticas de 25 g pueden ser compuestas. Dejar  $60 \pm 5$  minutos a temperatura ambiente e incubar  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  a  $35^\circ\text{C}$ .

**Caseína de cuajo:** Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 mL de caldo lactosa. Unidades analíticas de 25 g pueden ser compuestas. Dejar 60 minutos  $\pm 5$  minutos a temperatura ambiente e incubar  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  a  $35^\circ\text{C}$ .

**Caseinato de sodio:** Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 mL de caldo lactosa. Mezclar bien. Unidades analíticas de 25 g pueden ser compuestas Dejar 60 minutos  $\pm 5$  minutos a temperatura ambiente, mezclar bien por agitación y determinar el pH con papel indicador. Si es necesario ajustar el pH a  $6.8 \pm 0.2$  con NaOH 1N o HCl 1N. Incubar  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  a  $35^\circ\text{C}$ .

#### **Harina de soja**

Examinar como caseinato de sodio, excepto que unidades analíticas de 25 g no pueden ser compuestas

#### **Productos con huevo (fideos en general), queso, ensaladas preparadas (jamón, huevo, atún, pavo), pescado, frutas secas o congeladas, vegetales, crustáceos (langostino, cangrejo, camarones, langosta) y pescados**

Preferiblemente no descongelar las muestras antes del análisis. Si se debe descongelar realizarlo a  $45^\circ\text{C}$  durante menos de 15 minutos con agitación continua en baño de agua termostáticamente controlado o descongelar durante 18 h entre  $2^\circ\text{C}$  y  $5^\circ\text{C}$ .

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 mL de Caldo Lactosado. Dejar 60 minutos  $\pm 5$  minutos a temperatura ambiente, mezclar bien por agitación y determinar el pH con papel indicador. Si es necesario ajustar el pH a  $6.8 \pm 0.2$  Incubar  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  a  $35^\circ\text{C}$ .

#### **Caramelos y recubrimiento de caramelo (incluyendo chocolate)**

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 mL de leche descremada en polvo reconstituida y mezclar por 2 minutos. Dejar 60 minutos  $\pm 5$  minutos a temperatura ambiente, mezclar bien por agitación y determinar el pH con papel indicador. Si es necesario ajustar el pH a  $6.8 \pm 0.2$  Agregar 0.45 mL de solución acuosa de Verde Brillante al 1%. Incubar  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  a  $35^\circ\text{C}$ .

#### **Carnes, sustitutos de carne, sustancias de origen animal, productos glandulares y harinas (de pescado, carne, hueso)**

<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

Pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 mL de caldo lactosa y mezclar 2 minutos.

Dejar 60 minutos  $\pm$  5 minutos a temperatura ambiente, mezclar bien por agitación y determinar el pH con papel indicador. Si es necesario ajustar el pH a  $6.8 \pm 0.2$  Agregar como máximo 2.25 mL de *Tergitol Aniónico 7* calentado a baño maría (15 minutos) y mezclar bien. Alternativamente utilizar Tritón X-100 precalentado en baño maría (15 minutos). Usar la mínima cantidad para formar espuma. La cantidad dependerá de la composición del alimento. Incubar  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  a  $35^\circ\text{C}$ .

### **Jugo de naranja (pasteurizado y sin pasteurizar), sidra de manzana (pasteurizada y sin pasteurizar) y jugo de manzana pasteurizado**

Agregar 25 mL de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento Universal. Mezclar suavemente. Dejar 60 minutos  $\pm$  5 minutos a temperatura ambiente. No ajustar el pH. Incubar  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  a  $35^\circ\text{C}$ .

### **Tomates**


Para tomates cortados pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 mL de agua peptona bufferada (BPW) y mezclar por 2 minutos. Dejar 60 minutos  $\pm$  5 minutos a temperatura ambiente, mezclar bien por agitación y determinar el pH con papel indicador. Si es necesario ajustar el pH a  $6.8 \pm 0.2$  Incubar  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  a  $35^\circ\text{C}$ .

Para tomates enteros, no enjuagar si hay suciedad visible, examinar los tomates "tal cual". Colocar el tomate en una bolsa plástica estéril y agregar la cantidad necesaria de Caldo de pre-enriquecimiento Universal para que el tomate flote, generalmente el volumen es 1 peso del tomate (por ejemplo, si el tomate pesa 300 g se necesitan aproximadamente 300 mL del caldo de pre-enriquecimiento para que el tomate flote). Dejar 60 minutos  $\pm$  5 minutos a temperatura ambiente, no ajustar el pH. Incubar  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  a  $35^\circ\text{C}$ .

### **Melón**

Preferiblemente no descongelar las muestras antes del análisis. Si se debe descongelar realizarlo a  $45^\circ\text{C}$  durante menos de 15 minutos con agitación continua en baño de agua termostáticamente controlado o descongelar durante 18 h entre  $2^\circ\text{C}$  y  $5^\circ\text{C}$ . Para melón cortado pesar asépticamente 25 g de la muestra en un recipiente estéril de boca ancha o en otro recipiente apropiado y agregar 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento Universal y mezclar por 2 minutos. Dejar 60 minutos  $\pm$  5 minutos a temperatura ambiente, no ajustar el pH, mezclar bien por agitación, dejar la tapa del frasco floja e incubar  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  a  $35^\circ\text{C}$ .

Para melones enteros, no enjuagar si hay suciedad visible, examinar los melones "tal cual". Colocar el melón en una bolsa plástica estéril y agregar la cantidad necesaria de caldo de pre-

	<p align="center"><b>Procedimiento para la preparación de homogenizados y diluciones</b></p> <p align="center"><b>AOXLAB S.A.S</b></p>	<b>Identificación:</b> <b>PROC-TC-199</b>
		<b>Revisión: 4</b>
		<b>Inicio de vigencia:</b> <b>2025-05-20</b>

enriquecimiento Universal para que el melón flote, generalmente el volumen es 1.5 peso del melón (por ejemplo, si el melón pesa 1500 g se necesitan aproximadamente 2250 mL del caldo de pre-enriquecimiento para que el melón flote). Dejar 60 minutos  $\pm$  5 minutos a temperatura ambiente, no ajustar el pH. Incubar la bolsa sin cerrar totalmente, 24 h  $\pm$  2 h a 35°C

**Chocolate y alimentos que contienen chocolate (ej. más de un 20%)**

Agregar al BPW 50 g/l de caseína (evitar el uso de caseína ácida) o 100 g/l de leche en polvo descremada estéril. Después de 2 horas de incubación agregar 0.018 g/l de verde brillante si el alimento es sospechoso de tener una alta contaminación con flora Gram positiva.

**Enriquecimiento para alimentos ácidos**

Asegurarse que el pH no caiga por debajo de 4.5 durante el pre-enriquecimiento. En este caso el pH es más estable si se utiliza agua peptona bufferada (BPW) doble concentración. Incubar el pre-enriquecimiento a 37°C  $\pm$  1°C durante 18 h  $\pm$  2 h.

**Material vegetal de cannabis para detección molecular en MDS**

Se pesan 10 g de muestra y se adicionan 235mL de agua Tamponada a doble concentración y 240mL de leche descremada UHT o en caso de que no se tenga se puede preparar pesando 100 g de leche en polvo descremada en un litro de agua destilada y se lleva a esterilización en autoclave.

En caso de que no se cuente con la muestra suficiente se pesan 5g de muestra y se adicionan 117.5 mL de agua peptona a doble concentración y 120 mL de leche descremada (Metodología basada en protocolo 5 dado por proveedor de equipo)

También se puede realizar este análisis pesando 10 g de muestra y se adicionan 90 mL de caldo digerido de caseína de soja y se lleva a incubación durante 18-24 h. En caso de que no se cuente con la muestra suficiente se pesan 5g de muestra y se adicionan 45 mL de caldo digerido de caseína de soja.

**NOTA:** Para otros alimentos como huevos, levadura deshidratada, especias, coco, gelatina, ancas de rana, carcasas de conejo, goma guar, mango, alfalfa referir a la técnica Salmonella FDA-BAM: 2007, capítulo 5 o a las normas específicas para cada alimento